



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : <b>C12N 15/12, C07K 14/47, C12N 15/85, C07K 16/18, A61K 38/17, A01K 67/027</b>		A1	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 99/38969</b>
			(43) Date de publication internationale: <b>5 août 1999 (05.08.99)</b>
(21) Numéro de la demande internationale: <b>PCT/FR99/00196</b>		(74) Mandataires: <b>GILLARD, Marie-Louise etc.; Cabinet Beau de Loménie, 158, rue de l'Université, F-75340 Paris Cedex 07 (FR).</b>	
(22) Date de dépôt international: <b>29 janvier 1999 (29.01.99)</b>			
(30) Données relatives à la priorité: 98/01100 30 janvier 1998 (30.01.98) FR 98/15545 9 décembre 1998 (09.12.98) FR		(81) Etats désignés: <b>AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</b>	
(71) Déposants ( <i>pour tous les Etats désignés sauf US</i> ): INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cedex 13 (FR). INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 28, rue du Docteur Roux, F-75015 Paris (FR).		Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i>	
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants ( <i>US seulement</i> ): BENAROUS, Richard [FR/FR]; 19, rue Croulebarbe, F-75013 Paris (FR). MARGOTTIN, Florence [FR/FR]; 30, rue de Lourmel, F-75015 Paris (FR). DURAND, Hervé [FR/FR]; 20 ter, rue Damalouise, F-91850 Bouray-sur-Juine (FR). ARENZANA SEISDEDOS, Fernando [ES/FR]; 18, rue de Rushmoor, F-92190 Meudon (FR). KROLL, Mathias [DE/FR]; 22, rue Labrouste, F-75015 Paris (FR). CONCORDET, Jean-Paul [FR/FR]; 41, rue de Montreuil, F-94300 Vincennes (FR).			

(54) Title: PROTEIN HUMAINE  $\beta$ -TrCP(54) Titre: PROTEINE HUMAINE  $\beta$ -TrCP

## (57) Abstract

The invention concerns the human  $\beta$ -TrCP for homing proteins towards pathways degraded by proteasome capable of interacting with the HIV-1 virus Vpu protein, with I $\kappa$ B and  $\beta$ -catenin cell proteins and with the Skp1p cell protein, and its peptide fragments and the nucleic acid sequences coding for said proteins and its fragments. The invention also concerns the human  $\beta$ -TrCP protein or its peptide fragments for screening HIV-1 antiviral agents, and antitumoral agents and anti-inflammatory agents, the antitumoral agents, the anti-inflammatory agents and the antibodies directed against said protein and its peptide fragments.

## (57) Abrégé

La présente invention concerne la protéine humaine  $\beta$ -TrCP de ciblage des protéines vers les voies de dégradation par le protéasome qui est capable d'interagir avec la protéine Vpu du virus HIV-1, avec les protéines cellulaires I $\kappa$ B et  $\beta$ -caténine et avec la protéine cellulaire Skp1p, ainsi que ses fragments peptidiques et les séquences d'acides nucléiques codant pour ladite protéine et ses fragments. Elle concerne également l'utilisation de la protéine humaine  $\beta$ -TrCP ou de ses fragments peptidiques pour le criblage d'agents antiviraux anti-HIV-1, et d'agents antitumoraux et d'agents anti-inflammatoires, les agents antiviraux, les agents antitumoraux, les agents anti-inflammatoires et les anticorps dirigés contre ladite protéine et ses fragments peptidiques.

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun			PT	Portugal		
CN	Chine	KR	République de Corée	RO	Roumanie		
CU	Cuba	KZ	Kazakhstan	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LC	Sainte-Lucie	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LI	Liechtenstein	SE	Suède		
DK	Danemark	LK	Sri Lanka	SG	Singapour		
EE	Estonie	LR	Libéria				

PROTEINE HUMAINE  $\beta$ -TrCP

La présente invention a pour objet une nouvelle protéine humaine qui intervient dans le ciblage des protéines vers les voies de dégradation par le protéasome. Cette protéine, dénommée h- $\beta$ TrCP, est capable d'interagir notamment avec la protéine Vpu du virus HIV-1, ainsi qu'avec les protéines cellulaires I $\kappa$ B,  $\beta$ -caténine et Skp1p.

La dégradation des protéines par le protéasome, complexe multi-protéique présent dans toutes les cellules, est impliquée dans de nombreux phénomènes cellulaires essentiels comme le contrôle de la prolifération cellulaire, le renouvellement des protéines et l'élimination des protéines incorrectement repliées, en particulier au niveau du réticulum endoplasmique (CIECHANOVER, A., Cell, 79, 13-21, 1994). De nombreux virus, comme le virus HIV-1 qui dégrade CD4 par l'intermédiaire d'une de ses protéines Vpu (TRONO D., Cell, 82, 189-1992, 1995), utilisent à leur profit ces voies cellulaires de dégradation des protéines, dans lesquelles les protéines sont ciblées vers le protéasome par des interactions diverses avec d'autres protéines avant d'être dégradées. Pour être ciblées vers le protéasome et dégradées par celui-ci, les protéines doivent généralement être au préalable ubiquitinylées par des complexes ubiquitine-ligase. De plus, pour être ubiquitinylées, les protéines doivent souvent subir des modifications telles que des phosphorylations (CIECHANOVER, A. Embo. J., 17, 7151-7160, 1998).

A ce jour, on connaît plusieurs autres protéines de type  $\beta$ TrCP :

- la protéine  $\beta$ TrCP de Xenope décrite par Spevak et al. (Mol. Cell. Biol., 13, 4953-4966, 1993) ;
- la protéine Slimb de la drosophile décrite par Jiang et al. (Nature, vol. 391, 29 Janvier 1998) ;
- la protéine KIAA0696 mise en évidence par Ishikawa et al. (DNA Research, 5, 169-176, 1998) à l'occasion d'une analyse systématique de séquences exprimées dans le cerveau.

Jiang et al. ont montré que la protéine Slimb chez la drosophile est impliquée dans la stabilité de la protéine Armadillo et la signalisation de deux voies métaboliques essentielles pour le développement, à savoir les voies Hedgehog et Wingless. Ils ont également montré que la protéine Slimb a une 5 homologie de 80% environ avec la protéine  $\beta$ TrCP de Xenope dont aucune fonction n'a été décrite par Spevak et al. Comme la  $\beta$ -caténine chez le Xenope ou chez l'homme, qui est l'homologue de la protéine Armadillo de la drosophile, semble être ciblée vers les voies de dégradation du protéasome en l'absence de signalisation des voies Hedgehog et Wingless, ils suggèrent que chez l'homme, les 10 gènes codant pour les homologues de Slimb pourraient être impliqués dans la dégradation protéolytique de la  $\beta$ -caténine, protéine qui acquiert des propriétés oncogéniques quand elle n'est pas dégradée (POLAKIS, P., Biochim. Biophys. Acta 1332, F127-47, 1997).

Toutefois, même si la conservation des voies Wingless et Hedgehog 15 chez les vertébrés est importante, il n'est pas pour autant certain que la conservation des fonctions des protéines homologues sera totale. Il y a d'ailleurs de nombreux exemples qui montrent qu'il y a toujours des différences significatives entre espèces.

De plus, Jiang et al. ont établi l'implication de Slimb dans le contrôle 20 des voies Wingless et Hedgehog chez la drosophile uniquement sur la base d'études génétiques. Aucune preuve que ce contrôle est dépendant d'une interaction directe entre Slimb et Armadillo, par exemple, n'est ni recherchée, ni apportée.

La protéine selon l'invention, dénommée h- $\beta$ TrCP, est capable 25 d'interagir avec les protéines virales ou les protéines cellulaires susceptibles de servir de médiateurs ou d'être dégradées par le protéasome. En particulier, la protéine h- $\beta$ TrCP est capable d'interagir, notamment avec la protéine Vpu du virus HIV-1, ainsi qu'avec les protéines cellulaires I $\kappa$ B et  $\beta$ -caténine.

Elle est particulièrement utile pour le criblage d'agents thérapeutiques, 30 tels que notamment des agents antitumoraux, antiviraux, anti-inflammatoires et anti-Alzheimer.

La protéine Vpu est une petite protéine membranaire de 81 acides aminés, exprimée par la plupart des isolats du virus HIV-1 mais ni par ceux du virus humain HIV-2 nettement moins pathogène, ni par ceux du virus simien SIV (COHEN et al., *Nature*, 334, 532-534, 1988 ; et STREBEL et al., *Science*, 2, 5 1221-1223, 1988).

Une des fonctions de la protéine Vpu est sa capacité à induire la dégradation de la protéine CD4, récepteur cellulaire du virus HIV-1, participant ainsi à la diminution de l'expression du récepteur CD4 à la surface des cellules (Willey et al., *J. Virol.* 68, 1207-1212, 1994).

10 On sait également que les deux séries de phosphorylation de la protéine Vpu, situées en position 52 et 56, sont indispensables pour la dégradation de CD4 induite par Vpu (MARGOTTIN et al., *Virology*, 223, 381-386, 1996). En outre, lors du processus d'infection par le virus HIV-1, en l'absence de la protéine Vpu, le précurseur d'enveloppe Gp160 et la protéine CD4 nouvellement 15 synthétisée s'associent dans le réticulum endoplasmique, bloquant la maturation de la protéine Gp160 (BOUR et al., *J. Virol.*, 65, 6387-6396, 1991). La dégradation du récepteur CD4 médiée par la protéine Vpu est essentielle pour libérer la protéine d'enveloppe virale qui est retenue dans le réticulum endoplasmique par sa liaison à CD4 grâce à l'interaction avec la sous-unité Gp120, et permettre la 20 maturation normale de l'enveloppe vers la membrane plasmique et ultérieurement son intégration dans les particules virales, ce qui les rend infectieuses. Des études récentes ont mis en évidence le fait que la dégradation du récepteur CD4 médiée par la protéine Vpu est sensible aux inhibiteurs spécifiques du protéasome et est 25 dépendante de la présence d'une "machinerie d'ubiquitinylatation intacte" ( FUJITA et al., *J. Gen. Virol.*, 78, 619-625, 1997).

Ainsi, la protéine Vpu participe à des fonctions absolument critiques pour assurer la production de particules virales infectieuses en grand nombre, puisqu'elle intervient non seulement sur les produits du gène *gag*, c'est-à-dire sur les protéines de structure en augmentant le relâchement des particules virales, 30 mais aussi sur ceux du gène *env* en permettant la maturation de la protéine d'enveloppe suite à la dégradation du récepteur CD4. MARGOTTIN et al. 1996

(*supra*) ont montré que l'interaction entre Vpu et CD4 se faisait par l'intermédiaire de leur domaine cytoplasmique et que cette interaction n'était pas suffisante pour déclencher la dégradation du récepteur CD4.

La protéine Skp1p est une protéine cellulaire impliquée dans le ciblage 5 des protéines vers les voies de dégradation par le protéasome, lequel dépend de l'ubiquitinylation des protéines (PICKART C.M., The Faseb Journal, 11, 1055-1066, 1997).

BAI et al. (Cell, 86, 263-274, 1996) ont montré que la protéine Skp1p était nécessaire pour la protéolyse médiée par l'ubiquitine et que cette dégradation 10 se faisait grâce à l'interaction de Skp1p avec des protéines contenant un motif dénommé boîte F.

La protéine Skp1p est un facteur essentiel de ciblage de protéines régulatrices du cycle cellulaire par le protéasome. Le ciblage de la dégradation de ces régulateurs est en particulier nécessaire à l'entrée du cycle cellulaire en phase 15 S de synthèse d'ADN (PAGANO, M., The Faseb Journal, 11, 1068-1075, 1997). Des études récentes ont montré que la protéine Skp1p, avec des protéines à boîte F sont les éléments essentiels de complexes de haut poids moléculaires appelés SCF pour "Skp1p-Cullin-F-box-protein complexes". Ces complexes SCF jouent le rôle d'enzyme E3 qui par leur activité ubiquitine-ligase permettent la dernière étape de 20 l'ubiquitinylation de protéines substrats qui sont ainsi ciblées vers la dégradation par le protéasome (HOYT, A, Cell, 91, 149-151, 1997). Par ailleurs, on notera qu'il n'existe pas à ce jour d'homologue de Skp1p identifié chez la drosophile.

La protéine I $\kappa$ B, qui existe sous différentes formes ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ), est l'inhibiteur majeur du facteur de transcription NF $\kappa$ B, qui maintient celui-ci sous la 25 forme d'un complexe inactif dans le cytoplasme (Beg A. et al. Genes and Dev., 7, 2064-2070, 1993). Après stimulation des cellules par des facteurs tels que l'interleukine 1 (IL1) et le facteur de nécrose tumorale (TNF), la protéine I $\kappa$ B est phosphorylée sur les résidus sérine S32 et S36. Cette phosphorylation conduit très rapidement à l'ubiquitinylation de la protéine et à son ciblage vers la dégradation 30 par le protéasome. Le facteur NF $\kappa$ B actif, par exemple sous la forme de deux sous-unités P50 et P65, est alors libéré, importé dans le noyau où il va pouvoir

activer de très nombreux gènes et entraîner notamment des phénomènes inflammatoires.

La protéine  $\beta$ -caténine est une protéine cellulaire qui contrôle les voies essentielles de transduction de signaux, comme les voies Wingless, qui sont très conservées chez tous les vertébrés. (MILLER et al., Genes and Dev. 10, 2527-2539, 1996 et POLAKIS, P., Biochim. Biophys. Acta 1332, F 127-47, 1997). La  $\beta$ -caténine s'accumule dans les cellules cancéreuses, soit par suite de mutations qui empêchent la phosphorylation sur les résidus sérine 33 et 37 (protéines  $\beta$ -caténines mutées), soit par suite de mutations de son co-facteur, la protéine APC, qui est nécessaire à sa dégradation.

L'accumulation de la  $\beta$ -caténine, liée à sa non-dégradation, conduit à son importation dans le noyau et à l'activation de gènes contrôlés par des promoteurs TCF-LEF, ce qui provoque des phénomènes de transformation et prolifération cellulaire.

Il a été montré récemment que des mutations de la presenilin-1 chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer entraînaient une déstabilisation et une dégradation accrue de la  $\beta$ -caténine (ZHANG et al., Nature, 395, 698-702, 1998). Ces auteurs ont montré que la presenilin-1 non mutée se lie à la  $\beta$ -caténine et contribue ainsi à sa stabilité. Dans la maladie d'Alzheimer, la presenilin mutée n'est plus capable de se lier à la  $\beta$ -caténine, et cette dernière est alors dégradée plus rapidement. Le niveau de  $\beta$ -caténine est nettement diminué dans les cellules neuronales de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. La perte de la  $\beta$ -caténine entraîne une apoptose accrue des cellules neuronales qui serait responsable de la perte neuronale constatée dans cette pathologie.

On comprend aisément qu'il est urgent de trouver des moyens pour moduler, à savoir activer ou inhiber, le ciblage des protéines vers le protéasome.

On a maintenant trouvé une nouvelle protéine humaine qui est une protéine qui intervient dans le ciblage des protéines vers les voies de dégradation par le protéasome et qui permet de cibler des agents modulateurs du ciblage des protéines vers le protéasome.

La présente invention a donc pour objet une nouvelle protéine humaine, dénommée h- $\beta$ TrCP, qui présente la SEQ ID No.2 et qui intervient dans le ciblage des protéines vers les voies de dégradation par le protéasome.

La protéine h- $\beta$ TrCP possède 569 acides aminés et comporte une boîte 5 F et sept motifs WD dont la position dans la séquence SEQ ID N° 2 est la suivante :

- boîte F : acides aminés 147-191,
- premier motif WD : acides aminés 259-292,
- deuxième motif WD : acides aminés 304-332,
- 10 - troisième motif WD : acides aminés 343-372,
- quatrième motif WD : acides aminés 387-415,
- cinquième motif WD : acides aminés 427-455,
- sixième motif WD : acides aminés 467-492,
- septième motif WD : acides aminés 516-544.

15 En raison de l'homologie de cette nouvelle protéine avec la  $\beta$ TrCP de Xenope, protéine contenant des motifs  $\beta$ -transducine et connue en langue anglaise sous la dénomination " beta transducin repeats containing protein", la protéine de l'invention est dénommée h- $\beta$ TrCP (human- $\beta$ TrCP).

La protéine h- $\beta$ TrCP de l'invention est capable d'interagir, par 20 l'intermédiaire de ses motifs WD, avec les protéines susceptibles d'être dégradées par le protéasome, en particulier avec les protéines virales et les protéines cellulaires qui possèdent le motif de phosphorylation comprenant les acides aminés Asp-Ser-Gly-Xaa-Xaa-Ser dans lequel Xaa est un acide aminé naturel quelconque et dans lequel les résidus sérine sont phosphorylés.

25 La phosphorylation de ce motif Asp-Ser-Gly-Xaa-Xaa-Ser est indispensable à l'ubiquitylation et à la dégradation ultérieure des protéines qui possèdent ce type de motif. La protéine h- $\beta$ TrCP n'est capable d'interagir avec les protéines contenant ce motif que lorsque les deux résidus sérine sont phosphorylés et elle ne peut interagir avec des protéines contenant un motif de phosphorylation 30 dans lequel les résidus sérine sont mutés en acides aminés non phosphorylables. En interagissant avec les protéines phosphorylées sur ce motif, la protéine

h- $\beta$ TrCP contrôle leur ubiquitinylation et leur criblage vers le protéasome en vue de leur dégradation.

Parmi ces protéines, on peut citer notamment la protéine virale Vpu et les protéines cellulaires I $\kappa$ B et  $\beta$ -caténine.

5 On a aussi trouvé que la protéine h- $\beta$ TrCP interagit, par l'intermédiaire de sa boîte F, avec la protéine Skp1p ; elle fait donc partie d'un nouveau complexe SCF, SCF-h- $\beta$ TrCP, qui sélectionne certaines protéines cellulaires ou virales qui doivent être dégradées par le protéasome.

10 Par l'activité de criblage vers les voies de dégradation par le protéasome, la protéine h- $\beta$ TrCP, selon l'invention, joue le rôle de médiateur cellulaire de la protéine Vpu dans les cellules infectées par le virus HIV-1.

15 Sans pour autant vouloir se limiter à une théorie quelconque, on pense que, dans les cellules infectées par le virus HIV-1, le virus utilise, par l'intermédiaire de la protéine Vpu, le complexe SCF, dont la protéine  $\beta$ TrCP fait partie pour induire la dégradation du récepteur CD4 qui va favoriser la réplication virale et le relâchement des virions infectieux.

20 L'invention a aussi pour objet les fragments peptidiques de la protéine h- $\beta$ TrCP résultant de l'addition, la suppression et/ou le remplacement d'un ou plusieurs acides aminés, lesdits fragments peptidiques ayant conservé l'activité d'interaction avec les protéines susceptibles d'être dégradées par le protéasome, en particulier avec la protéine Vpu du virus HIV-1, avec la protéine cellulaire I $\kappa$ B ou la protéine cellulaire  $\beta$ -caténine et/ou avec la protéine Skp1p.

25 L'invention concerne en particulier les fragments peptidiques qui comprennent au moins l'une des séquences en acides aminés de h- $\beta$ TrCP ci-après :

251-569,

292-569,

292-396,

292-545 et

30 1-291.

On préfère tout particulièrement les fragments peptidiques dénués en partie ou en totalité de la boîte F ou ceux qui sont dénués en partie ou en totalité des motifs WD.

Un fragment peptidique particulièrement préféré est le mutant déléte 5 des résidus 32-179, dénommé ci-après  $\beta$ TrCP $\Delta$ F.

La présente invention a également pour objet les séquences d'acides nucléiques, à savoir les séquences d'ADN génomique, les séquences d'ADNc ou d'ARNm qui comprennent ou sont constituées par un enchaînement de nucléotides codant pour la protéine h- $\beta$ TrCP ou pour l'un quelconque de ses fragments 10 peptidiques tels que définis précédemment.

L'invention concerne notamment les séquences d'acides nucléiques codant pour la protéine h- $\beta$ TrCP et ses fragments peptidiques décrits ci-dessus qui sont représentées par :

- a) les séquences d'ADNc SEQ ID No.1 codant pour ladite protéine h- $\beta$ TrCP et 15 des fragments d'acides nucléiques codant pour lesdits fragments peptidiques ;
- b) les séquences d'ADN hybridant dans des conditions strictes avec les séquences ci-dessus ;
- c) les séquences d'ADN qui, en raison de la dégénérescence du code génétique, résultent des séquences a) et b) ci-dessus et codent pour la protéine h- $\beta$ TrCP ou 20 ses fragments ; et
- d) les séquences d'ARNm et d'ADN correspondantes.

Les protéines et fragments peptidiques selon l'invention peuvent être obtenus par la technique du génie génétique qui comprend les étapes de :

- culture d'un microorganisme transformé ou de cellules eucaryotes transformées à 25 l'aide d'une séquence d'acides nucléiques selon l'invention et
- récupération de la protéine ou du fragment peptidique produit par ledit microorganisme ou lesdites cellules eucaryotes.

Cette technique est bien connue de l'homme du métier. Pour plus de détail la concernant, on pourra se référer à l'ouvrage ci-après : Recombinant DNA 30 Technology I, Editors Ales Prokop, Rakesh K Bajpai ; Annals of the New-York Academy of Sciences, volume 646, 1991.

Ils peuvent également être préparés par les synthèses peptidiques classiques bien connues de l'homme du métier.

Les acides nucléiques selon l'invention peuvent être préparés par synthèse chimique et génie génétique en utilisant les techniques bien connues de 5 l'homme du métier et décrites par exemple dans SAMBROOK et al. (*supra*).

Par exemple, la synthèse des séquences d'ADNc selon l'invention peut être effectuée par amplification des ARNm de cellules humaines à l'aide de la méthode PCR (Polymerase Chain Reaction), comme décrit par exemple par GOBLET et al. (Nucleic Acid Research, 17, 2144, 1989) en utilisant des 10 oligonucléotides synthétiques comme amorces, définis à partir de la séquence d'ADN SEQ ID No.1.

Le fragment d'acides nucléiques amplifié peut ensuite être cloné selon les techniques décrites dans AUSUBEL et al. (Current Protocols in Molecular Biology, chapter 3, *supra*).

15 L'invention a également pour objet des animaux transgéniques exprimant un transgène de la protéine h- $\beta$ TrCP de l'invention ou des animaux transgéniques dans lesquels le gène  $\beta$ TrCP a été invalidé.

Ces animaux transgéniques ou invalidés pour le gène de la protéine h- $\beta$ TrCP pourront servir de modèles d'étude *in vivo* de la perturbation du cycle 20 cellulaire et de la prolifération par l'absence ou la surexpression du gène de la protéine h- $\beta$ TrCP ou de formes tronquées ou mutées de cette protéine, de la protéine Skp1p, de la protéine Vpu, de la protéine I kB ou de la protéine  $\beta$ -caténine.

Ces animaux transgéniques sont obtenus par des techniques bien 25 connues de l'homme du métier, telles que celles décrites dans Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual. HOGAN, B., BEDDINGTON, R., COSTANTINI, F. & LACY, E. Cold Spring Harbor laboratory press, second edition, 1994.

A titre d'animaux, on préfère les mammifères tels que la souris ou le 30 rat.

L'invention a également pour objet les microorganismes procaryotes et les cellules eucaryotes transformés à l'aide d'un vecteur d'expression contenant une séquence d'ADN selon l'invention. Ce vecteur d'expression, qui peut être par exemple sous la forme d'un plasmide, doit comporter, outre la séquence d'ADN de l'invention, les moyens nécessaires à son expression, tels que notamment un promoteur, un terminateur de transcription, une origine de réplication et de préférence un marqueur de sélection. La transformation des microorganismes et des cellules eucaryotes est une technique bien connue de l'homme du métier qui pourra aisément déterminer, en fonction du microorganisme à transformer, les moyens nécessaires à l'expression de la séquence d'ADN selon l'invention.

Le microorganisme préféré aux fins de l'invention est *E. coli* alors qu'on utilise de préférence *Saccharomyces cerevisiae* comme levure.

A titre d'exemples de cellules eucaryotes qui conviennent aux fins de l'invention, on peut citer notamment les cellules COS, CHO, SF9, Jurkat, etc., toutes étant répertoriées à l'ATCC.

L'invention a également pour objet les cellules eucaryotes co-transformées avec des vecteurs d'expression contenant d'une part la séquence d'ADN codant pour la protéine Vpu, pour la protéine Skp1p, pour la protéine IκB ou pour les protéines β-caténine mutées, et d'autre part une séquence codant pour la protéine h-βTrCP, lesdits vecteurs d'expression contenant de plus des moyens utiles à leur expression, y compris dans le système double-hybride en levure.

La présente invention a donc également pour objet les agents antiviraux anti-HIV-1 qui sont constitués par les fragments peptidiques de la protéine h-βTrCP de l'invention qui ont conservé les propriétés d'interaction de la protéine h-βTrCP soit avec la protéine Vpu, soit avec la protéine Skp1p. Ces fragments peptidiques sont dénués de la boîte F ou des motifs WD de sorte qu'ils ne peuvent plus interagir avec la protéine Skp1p ou la protéine Vpu, respectivement.

On peut encore citer, à titre d'agents antiviraux, d'agents antitumoraux ou d'agents anti-inflammatoires, des anticorps dirigés contre la protéine h-βTrCP

de l'invention et ses fragments peptidiques, ce qui constitue un autre objet de l'invention.

Ces anticorps peuvent être des anticorps monoclonaux obtenus par le procédé bien connu de KOHLER et MILSTEIN (Nature, 256, 495-497, 1975) ou 5 des anticorps polyclonaux obtenus selon les procédés classiques d'immunisation d'animaux (Antibodies, a laboratory manual. E. Harlow & D. Lane. Cold Spring Harbor laboratory press, 1988).

On peut enfin citer comme agents antiviraux, agents antitumoraux ou agents anti-inflammatoires, les oligonucléotides antisens bloquant la transcription 10 ou la traduction de la protéine h- $\beta$ TrCP de l'invention qui s'hybrident avec une séquence d'acides nucléiques telle que définie précédemment, ce qui constitue également un autre objet de la présente invention.

Ces oligonucléotides antisens sont préparés par des techniques bien connues de l'homme du métier, telles que celles décrites par AUSUBEL et al. 15 (Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, New-York, 1989, Mises à jour jusqu'en 1997).

Les fragments peptidiques de h- $\beta$ TrCP, qui possèdent la boîte F ou qui ont conservé à la fois les motifs WD et la boîte F, peuvent être utilisés comme agents antitumoraux ou anti-inflammatoires.

20 Les fragments peptidiques de h- $\beta$ TrCP, qui sont dépourvus de la boîte F, peuvent être utilisés en thérapie génique pour le traitement des maladies inflammatoires ostéo-articulaires ou des syndromes inflammatoires aigus qui s'accompagnent d'une activation de NF $\kappa$ B induite par la libération massive de TNF $\alpha$  lors de ces processus.

25 Comme illustré sur la figure 7, l'expression de h- $\beta$ TrCP $\Delta$ F est capable d'inhiber massivement par un facteur d'environ 20 fois l'activation transcriptionnelle induite par TNF $\alpha$ . Donc dans toutes les pathologies marquées par une réaction inflammatoire intense due à une libération de TNF $\alpha$ , la h- $\beta$ TrCP $\Delta$ F pourrait agir comme un puissant agent anti-inflammatoire. Il y a par 30 exemple actuellement plusieurs tentatives pour mettre en oeuvre une thérapie génique de la polyarthrite rhumatoïde, avec injection dans les articulations lésées

de virus recombinants. On peut utiliser dans ces essais de thérapie génique des syndromes inflammatoires, des vecteurs exprimant la h- $\beta$ TrCP $\Delta$ F. Ces vecteurs pourront être de plusieurs types (rérovirus, adénovirus ; ANDERSON F., Nature, 392, 25-30, 1998). L'expression de la h- $\beta$ TrCP $\Delta$ F pourra être contrôlée par ses effets sur l'inhibition de l'activation de NF $\kappa$ B par TNF.

La présente invention a aussi pour objet l'utilisation de la protéine h- $\beta$ TrCP ou des séquences d'acides nucléiques codant pour cette protéine ou pour ses fragments peptidiques pour le criblage d'agents thérapeutiques susceptibles de moduler l'interaction de la protéine h- $\beta$ TrCP avec les protéines susceptibles d'être dégradées par le protéasome, en particulier pour le criblage :

- d'agents antiviraux anti-HIV-1 susceptibles d'inhiber l'interaction entre la protéine h- $\beta$ TrCP et la protéine Vpu et/ou d'inhiber l'interaction entre la protéine h- $\beta$ TrCP et la protéine Skp1p,
- d'agents antitumoraux capables de perturber la régulation du cycle cellulaire ou des processus de dégradation des protéines dans des cellules humaines tumorales par modulation (inhibition ou activation) de l'interaction entre la protéine h- $\beta$ TrCP et la protéine Skp1p, ainsi que par réactivation de l'interaction entre la protéine h- $\beta$ TrCP et les protéines  $\beta$ -caténine mutées dans les cellules tumorales ou entre la protéine  $\beta$ TrCP et la protéine  $\beta$ -caténine normale dans les cellules tumorales dépourvues de la protéine APC.
- d'agents anti-inflammatoires capables de perturber l'activation du facteur de transcription NF $\kappa$ B par inhibition de l'interaction entre la protéine h- $\beta$ TrCP et la protéine I $\kappa$ B,
- d'agents anti-Alzheimer capables de réduire le taux de dégradation de la  $\beta$ -caténine dans les cellules neuronales par inhibition de l'interaction entre la protéine h- $\beta$ TrCP et la protéine  $\beta$ -caténine.

En effet, en perturbant les interactions Vpu/h- $\beta$ TrCP et/ou Skp1p/h- $\beta$ TrCP, on peut :

- soit inhiber la réplication et la production du virus HIV-1 par des cellules infectées ;

- soit inhiber l'entrée en phase S du cycle cellulaire et avoir un effet antiprolifératif.

En perturbant les interactions I<sub>K</sub>B/h- $\beta$ TrCP et/ou Skp1p/h- $\beta$ TrCP, on peut inhiber la dégradation de la protéine I<sub>K</sub>B par le 5 protéasome et donc inhiber l'activation du facteur de transcription NF<sub>K</sub>B.

Enfin, en activant l'interaction  $\beta$ -caténine mutée/h- $\beta$ TrCP, on peut activer la dégradation de la  $\beta$ -caténine accumulée dans les cellules tumorales. En inhibant l'interaction  $\beta$ -caténine /h- $\beta$ TrCP chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, on peut réduire l'apoptose des cellules neuronales.

10

#### Criblage de modulateurs de l'interaction h- $\beta$ TrCP/protéines

On peut sélectionner les agents antiviraux soit à partir de banques aléatoires de peptides, à la surface de phages (SCOTT J. et al., Science, 249, 386-390, 1990), soit en utilisant des oligonucléotides de synthèse aléatoires selon la 15 technique de type SELEX (TUERK et GOLD, Science, 249, 505-510, 1990). Cette technique permet d'isoler à partir d'un pool très large d'oligonucléotides, ceux qui ont une grande affinité pour la protéine d'intérêt, dans le cas présent la protéine h- $\beta$ TrCP. Ils sont dénommés aptamers. Parmi ces aptamers, on pourra sélectionner ceux qui inhibent les deux interactions Vpu/h- $\beta$ TrCP et 20 Skp1p/h $\beta$ TrCP par le criblage ci-après.

Le criblage défini ci-dessus peut par exemple être réalisé en utilisant le système double-hybride en levure dans lequel des cellules de levure co-exprimant la protéine h- $\beta$ TrCP selon l'invention et l'une des protéines Vpu, I<sub>K</sub>B ou  $\beta$ -caténine, la protéine Skp1p, sont cultivées sur des milieux sélectifs appropriés en présence de la substance à tester ; les milieux sélectifs sont les milieux couramment utilisés dans ce domaine et donc bien connus de l'homme du métier.

Le système double-hybride en levure est décrit par FIELDS et SONG dans Nature, 340-245-246, 1989 et dans le brevet US 5 667 973. Ce système double-hybride, est basé sur la détection des interactions protéine-protéine par

activation du gène rapporteur His ou LacZ sous le contrôle de domaines de l'activateur transcriptionnel Gal4 dans la levure.

Dans ce système double-hybride, on cotransforme une levure par un vecteur double-hybride contenant l'ADNc de l'une des protéines et un vecteur 5 contenant l'ADNc de l'autre protéine, chacun desdits vecteurs contenant soit un domaine de liaison à l'ADN soit un domaine d'activation de la transcription. On fait ensuite exprimer par la levure les deux protéines dans un milieu de culture approprié, par exemple un milieu de culture sans histidine. L'interaction entre les deux protéines hybrides permet l'activation du gène His3 et la croissance des 10 levures sur un milieu sans histidine d'une part, ainsi que l'activation du gène LacZ qui est révélée par une réaction colorimétrique spécifique de la  $\beta$ -galactosidase. On peut donc vérifier l'interaction lorsque les levures poussent sur un milieu sans histidine et lorsqu'on observe une réaction colorimétrique.

On peut également utiliser le test du halo tel que décrit par Valtz & 15 Peter (Meth-Enzymol-283, 350-365, 1997) pour détecter s'il y a interaction.

On peut également utiliser des variantes du système double-hybride, telles que le système triple-hybride décrit par TIRODE et al. (J. Biol. Chem., 272, 22995-22999, 1997), ou par COLAS et al. (Nature, 380, 548-550, 1996) dans lequel un peptide inhibiteur de l'interaction peut être exprimé comme troisième 20 partenaire pour inhiber l'interaction des deux autres. Une banque de peptides aléatoires peut aussi être utilisée de la sorte.

On peut aussi utiliser le système reverse-hybride décrit par VIDAL et al. (Proc. Natl. Acad. Sci., 93, 10315-10320), dans lequel on sélectionne non pas pour une interaction mais contre une interaction. On peut dans ce système, comme 25 dans le système double-hybride classique, cribler des banques de petites molécules chimiques, y compris issues de la synthèse chimique pour mettre, les levures cotransformées avec les vecteurs double-hybride ou réverse hybride porteurs des fusions avec la protéine Vpu, la protéine I $\kappa$ B, la  $\beta$ -caténine, la protéine h- $\beta$ TrCP ou la protéine Skp1p, en présence de ces petites molécules à la recherche d'un 30 inhibiteur des interactions Vpu-h- $\beta$ TrCP et Skp1p-h- $\beta$ TrCP ou  $\beta$ -caténine-h- $\beta$ TrCP ou encore I $\kappa$ B-h- $\beta$ TrCP.

5 Les tests de criblage d'inhibiteurs d'interaction pourront également être effectués en double-hybride par conjugaison (FROMONT-RACINE et al., *Nature Genetics*, 16, 277-282, 1997), par double-hybride membranaire (BRODER Y.C. et al., *Curr. Biol.*, 8, 1121-1124, 1998), et éventuellement, si les phosphorylations peuvent prendre place dans les bactéries, par double-hybride bactérien (KARIMOVA et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95, 5752-5756, 1998).

10 Ce criblage peut aussi être effectué *in vitro* en utilisant l'une des protéines Vpu, I $\kappa$ B,  $\beta$ -caténine, ou la protéine Skp1p, et la protéine h- $\beta$ TrCP, l'une des protéines étant immobilisée sur un support approprié et l'autre étant marquée par un moyen quelconque utilisé dans les moyens de détection de substances biologiques, ce moyen de marquage pouvant être par exemple un isotope radioactif, un agent luminescent, de la biotine ou un anticorps spécifique.

15 L'une des protéines sera de préférence immobilisée sous la forme d'une protéine de fusion avec la glutathion S-transférase (GST) sur des billes d'agarose-glutathion ou en plaques de microtitration, la GST servant d'agent de couplage de ladite protéine sur les billes ou sur les puits des plaques.

20 A cet effet, on peut utiliser notamment le test de scintillation à proximité (SPA) décrit par BOSWORTH et al. (*Nature*, 341, 167-168, 1989) et commercialisé par Amersham. Ce test consiste à marquer par un élément radioactif, par exemple le tritium, l'une des protéines et à immobiliser l'autre protéine sur des billes magnétiques ou sur des billes d'agarose-glutathion. L'effet inhibiteur des substances à tester sur les interactions impliquant la protéine h- $\beta$ TrCP peut être facilement détecté sans séparation des espèces radioactives liées ou libres selon les protocoles décrits par BOSWORTH et al. (*supra*).

25 On peut également utiliser la technique "Surface Plasmon Resonances" décrite par KARLSSON et al. (*J. Immunol. Methods*, 145, 229-233, 1991) utilisant le Biacore commercialisé par Pharmacia, pour isoler les inhibiteurs des interactions impliquant la protéine h- $\beta$ TrCP selon l'invention.

30 L'activité inhibitrice des agents antiviraux ainsi sélectionnés pourra être vérifiée par des tests sur des cellules T CD $4+$  ou sur des chimpanzés infectés par les virus HIV-1 ou SIV Cpz.

On peut également isoler les agents antitumoraux et les agents anti-inflammatoires, ligands de la protéine h- $\beta$ TrCP de l'invention, par les techniques double-hybride ou apparentées ou par interaction *in vitro* avec des banques combinatoires de peptides ou autres produits chimiques, comme décrit 5 précédemment.

La spécificité des agents antiviraux, antitumoraux ou anti-inflammatoires sélectionnés par le test double-hybride peut être ensuite déterminée par culture de cellules de mammifères, par exemple de cellules humaines transfectées avec la protéine  $\beta$ -TrCP ou un fragment de celle-ci, en 10 présence d'un gène rapporteur spécifique de la protéine impliquée dans la pathologie que l'on souhaite traiter.

Ainsi, pour la protéine I $\kappa$ B, on pourra utiliser des cellules humaines provenant des lignées cellulaires Hela, 293, 293T, etc. et le gène rapporteur dépendant des sites NF $\kappa$ B (3Enh- $\kappa$ B-ConA Luc) qui contrôle l'expression de la 15 luciférase.

Dans les cellules humaines non stimulées, la protéine  $\beta$ TrCP humaine est exprimée transitoirement à partir d'un vecteur d'expression eucaryote tel que pCDNA3 (Invitrogen) ou tout autre vecteur d'expression eucaryote, ayant inséré l'ADN codant pour la protéine  $\beta$ TrCP sous le contrôle d'un promoteur fort du 20 cytomégalovirus CMV ou autre. Une quantité de l'ordre de 3 $\mu$ g de ce vecteur qui permet l'expression de la protéine  $\beta$ TrCP sera cotransfectée par l'une des techniques courantes de transfection (phosphate de calcium, lipofectamine (Life technologies), électroporation (Ausubel et Sambrook, ci-après) etc., avec 1 $\mu$ g d'un vecteur rapporteur dépendant (3Enh- $\kappa$ B-ConA luc) ou indépendant (RSV Luc ou 25 ConA Luc) de sites NF $\kappa$ B qui contrôlent l'expression du gène rapporteur luciférase. Des molécules capables d'inhiber l'interaction h- $\beta$ TrCP-I $\kappa$ B inhiberont l'augmentation d'expression de luciférase dans ce test. Ces inhibiteurs seront ajoutés au milieu de culture pendant au moins 6 heures, 24, 36 ou 48 heures après 30 la transfection. On pourra contrôler la spécificité de ces inhibiteurs en vérifiant qu'ils n'ont aucun effet sur RSV Luc ou ConA Luc. On pourra également utiliser le

système Dual luciférase de Promega, dans lequel on peut tester en même temps deux vecteurs rapporteurs différents.

Selon un protocole expérimental similaire à celui décrit ci-dessus, mais avec des cellules stimulées, on pourra vérifier que l'inhibition induite par 5 l'expression du fragment h- $\beta$ TrCP $\Delta$ F sur l'activation transcriptionnelle TNF-dépendante a été annulée.

Ainsi, dans ce second test, les cellules humaines sont cotransfектées avec 1 $\mu$ g de vecteur rapporteur, soit 3Enh- $\kappa$ B-ConA Luc, soit ConA Luc ou RSV Luc, avec 3 $\mu$ g de pCDNA3 exprimant le fragment peptidique h- $\beta$ TrCP $\Delta$ F, mutant 10 de la  $\beta$ TrCP déletée de sa boîte F. 24 à 48 h après la transfection, les cellules sont traitées pendant 6 h au TNF ou à l'acide okadaïque (OKA) qui sont de puissants activateurs de NF $\kappa$ B (BAUERLE et al., Cell, 1996, 87, 13-20). Le mutant h- $\beta$ TrCP $\Delta$ F a un effet inhibiteur massif sur l'expression du rapporteur luciférase, par rapport à un plasmide contrôle transfecté dans les mêmes conditions. Cet effet est dû 15 à l'inhibition de la dégradation de I $\kappa$ B induite par la liaison du mutant h- $\beta$ TrCP $\Delta$ F en lieu et place de la protéine h- $\beta$ TrCP sauvage endogène. De ce fait, un agent inhibiteur de l'interaction h- $\beta$ TrCP-I $\kappa$ B inhibera aussi l'interaction h- $\beta$ TrCP $\Delta$ F-I $\kappa$ B, et donc inversera l'effet inhibiteur du fragment h- $\beta$ TrCP $\Delta$ F. Les inhibiteurs 20 potentiels sont ajoutés au milieu dans les mêmes conditions que celles indiquées ci-dessus. On choisit dans les cellules stimulées au TNF ou à l'OKA, les inhibiteurs qui induisent une augmentation de l'expression du gène rapporteur.

Après avoir sélectionné des inhibiteurs dans les deux tests précédents, on peut vérifier dans un troisième test qu'ils sont capables d'inhiber l'activation de NF $\kappa$ B induite par la stimulation des cellules au TNF ou à l'OKA.

25 On traite avec les inhibiteurs potentiels les cellules transfectées uniquement par 1  $\mu$ g de vecteur rapporteur (3Enh- $\kappa$ B-ConA Luc) et stimulées pendant 6 h au TNF ou à l'OKA. Ces inhibiteurs, pour être spécifiques, ne devront avoir d'effet que sur les vecteurs rapporteurs dépendants de I $\kappa$ B, et non sur les autres vecteurs rapporteurs (ConA ou RSV).

Pour la  $\beta$ -caténine, on pourra utiliser des cellules humaines provenant des lignées ci-dessus transformées avec la  $\beta$ -caténine mutée ou le fragment peptidique de  $\beta$ TrCP dépourvu de la boîte F en présence du vecteur Top-TK-Luci qui contient un multimère de sites TCF-LEF répondant à la  $\beta$ -caténine ou 5 Fop-tk Luci qui contient un multimère muté inactif et qui ne répond plus à la  $\beta$ -caténine.

#### Détection de mutations de $\beta$ -caténine

De plus, comme on peut aisément distinguer une  $\beta$ -caténine mutée 10 oncogénique de la  $\beta$ -caténine sauvage par le fait que la première, contrairement à la seconde, est incapable de se lier à la  $\beta$ -TrCP en double-hybride, on peut détecter des mutations de la  $\beta$ -caténine dans les tumeurs humaines, par mesure en double-hybride de l'interaction avec la  $\beta$ -TrCP.

Ce test est intéressant: car on constate des mutations de la 15  $\beta$ -caténine dans de nombreux cancers, tels que cancer du colon, mélanome, hépatocarcinomes, etc. La seule manière de détecter ces mutations jusqu'à présent a été de séquencer la  $\beta$ -caténine à partir de RT-PCR sur l'ARN des tumeurs étudiées. Pour plus de sécurité, plusieurs séquences double brins doivent être 20 faites dans ce test de l'art antérieur. De plus, l'existence d'une mutation ne signe pas en elle-même le caractère oncogénique de cette mutation. Il pourrait s'agir d'un polymorphisme sans aucun lien avec la tumorigénérité.

L'avantage du test double-hybride avec la protéine  $\beta$ -TrCP permet 25 d'obtenir dans des délais équivalents à ceux nécessaires à l'obtention d'une séquence, une réponse claire quant au pourcentage de séquences oncogéniques mutées de la  $\beta$ -caténine détectées à partir de l'ARN tumoral. Sur un grand nombre de colonies, le pourcentage de formes oncogéniques de la  $\beta$ -caténine incapables 30 d'interagir avec la  $\beta$ -TrCP, par rapport aux formes sauvages qui interagissent avec la  $\beta$ -TrCP, peut être déterminé précisément. Le test peut s'effectuer dans un temps équivalent à celui nécessaire pour l'obtention de quelques séquences, et pour un coût réduit.

Les étapes de ce test sont les suivantes :

- 1- Préparation de l'ARN total d'une biopsie d'une tumeur et du tissu sain environnant comme contrôle, par l'une des diverses techniques ou kits de préparation de l'ARN (AUSUBEL et al., *Current protocols in Molecular Biology*).
- 5 2- Amplification par RT-PCR à partir des échantillons ARN, des séquences  $\beta$ -caténine de la tumeur et du tissu sain environnant, en utilisant un couple d'oligonucléotides permettant l'amplification soit uniquement de la partie N-terminale (1-130) qui contient les mutations oncogéniques les plus fréquemment rencontrées (RUBINFELD, B. et al., *Science*, 275, 1790-1792, 1997 ;
- 10 10 DE LA COSTE et al., *Proc. Natl.Acad.Sci. USA*, 95, 8847-8851, 1998), soit de l'ensemble de la séquence codante de la  $\beta$ -caténine.
- 15 3- Insertion de ces fragments amplifiés par ligation dans un des vecteurs double-hybride, comme par exemple pGAD1318, de manière à obtenir une fusion en phase avec le domaine d'activation de la transcription de Gal4, ou du domaine équivalent d'activation de la transcription ou de liaison à l'ADN codé par le vecteur double-hybride utilisé.
- 4- Transformation de bactéries de diverses souches appropriées et également de la totalité de la transformation sur milieu LB-ampicilline.
- 15 5- Recueil de l'ensemble des colonies et minipréparation de plasmide (AUSUBEL, *supra*).
- 20 6- Des levures L40 ou toute autre souche de levure appropriée, seront cotransformées par le plasmide contenant les séquences  $\beta$ -caténine de la minipréparation ci-dessus avec un hybride de fusion contenant la  $\beta$ TrCP, par exemple pLexA- $\beta$ TrCP, dans lequel la  $\beta$ TrCP est fusionnée au domaine de liaison à l'ADN de LexA. Un essai double-hybride est effectué sur l'ensemble des colonies obtenues, par exemple par également des levures cotransformées sur milieu DO-W-L, puis transfert des colonies sur milieu sélectif pour la détection des interactions, c'est-à-dire milieu DO-W-L-H, ou en présence de X-Gal pour la détection des interactions par production de  $\beta$ -galactosidase (BARTEL P. &
- 25 30 FIELDS S., *Meth. Enzymol.*, 254, 241-263, 1995).

Les réactifs nécessaires pour ce test sont les suivants :

- 1- Un vecteur pGAD1318 prédigéré aux sites appropriés pour insérer le fragment amplifié obtenu par RT-PCR.
- 2- Les oligonucléotides appropriés pour amplifier la séquence de la  $\beta$ -caténine et insérer ensuite les séquences  $\beta$ -caténine amplifiées. Les oligonucléotides amorces pour l'amplification seront choisis en fonction du mode d'insertion du fragment amplifié et des sites retenus.
- 5 3- Le plasmide pBTM116- $\beta$ TrCP exprimant la  $\beta$ TrCP en fusion avec le domaine de liaison à l'ADN de LexA.
- 10 4- A titre de contrôle des plasmides codant pour des hybrides de fusion avec des protéines contrôles, par exemple pLexRas et pGAD1318Raf.

On pourra également, pour ce test, appliquer la technique de "Gap repair" (SCHWARTZ, H., et al. *Mutation detection by a two-hybrid assay.*, Hum. Mol. Gen., 7, 1029-1032, 1998) pour insérer la séquence du fragment amplifié de 15 la  $\beta$ -caténine dans le vecteur double-hybride et transformer directement des levures sans passer par l'étape de transformation préalable dans les bactéries.

L'invention va maintenant être décrite en détail à l'aide de l'exposé expérimental ci-après.

Une grande partie des techniques décrites dans ces exemples, bien 20 connues de l'homme du métier, est exposée en détail dans l'ouvrage de SAMBROOK et al. (*supra*) ou dans l'ouvrage de AUSUBEL et al. (*supra*).

La description ci-après sera mieux comprise à l'aide des figures 1 à 12 sur lesquelles :

- la figure 1A est la photographie d'une boîte de Petri montrant la 25 croissance de cellules de levure cotransformées par les plasmides contenant  $Vpu_C$  + VBP1 ;  $Vpu_C$  + h- $\beta$ TrCP ;  $Vpu_{C-2/6}$  + h- $\beta$ TrCP ;  $Vpu_C$  ; h- $\beta$ TrCP +  $Vpu_C$  et h- $\beta$ TrCP +  $CD4_C$  sur milieu en présence d'histidine (His+), sur milieu en l'absence d'histidine (His-) et sur milieu en présence du substrat de la  $\beta$ -galactosidase X-Gal ( $\beta$ -Gal) ;

- la figure 1B est la photographie d'un gel (Northern blot) montrant 3 ARNm de la protéine h- $\beta$ TrCP de l'invention ;
- la figure 1C est la photographie d'un immunoblot montrant l'expression de la protéine h- $\beta$ TrCP de l'invention ;
- 5 - la figure 2 donne les séquences de 4 protéines, h- $\beta$ TrCP de l'invention et  $\beta$ TrCP1 de *Xenopus*, Met30p de *Saccharomyces cervisiae* et Scon2p de *Neurospora crassa* ;
- la figure 3 est la photographie d'un gel SDS-PAGE 15% montrant l'interaction entre Vpu<sub>C</sub> et la protéine h- $\beta$ TrCP de l'invention produite *in vitro* ;
- 10 - la figure 4 est la photographie d'une boîte de Petri montrant la croissance de cellules de levure cotransformées par les plasmides contenant Skp1p + h- $\beta$ TrCP ; Skp1p + h- $\beta$ TrCP- $\Delta$ 7W ; Skp1p + VBP1 et Skp1p + CD4<sub>C</sub> sur milieu en présence d'histidine (His+) , sur milieu en l'absence d'histidine (His-) et sur milieu en présence du substrat de la  $\beta$ -galactosidase X-Gal ( $\beta$ -Gal) ;
- 15 - la figure 5 est une représentation schématique de la dégradation du récepteur CD4 induite par la protéine Vpu présentant le réseau d'interactions décrit précédemment ;
- la figure 6 est la photographie d'une boîte de Petri montrant la croissance de cellules de levure cotransformées par les plasmides contenant 20  $\beta$ TrCP + I $\kappa$ B $\alpha$  ;  $\beta$ -TrCP + I $\kappa$ B $\alpha$  S32-36AA ;  $\beta$ TrCP + Raf ; Ras + I $\kappa$ B $\alpha$  ;  $\beta$ TrCP + Vpu et Ras + Raf sur milieu His+, sur milieu His- et l'expression de  $\beta$ -Gal ;
- la figure 7 est une représentation graphique montrant l'expression de la luciférase (exprimée en unités de lumière par  $\mu$ g : RLU/ $\mu$ g de protéine ) dans les cellules transfectées avec les constructions h- $\beta$ TrCP et h- $\beta$ TrCP $\Delta$ F et les 25 plasmides de contrôle et les vecteurs rapporteurs ci-après : 3Enh-KB-ConA luc ; ConA luc ; RSV luc ;
- la figure 8 est la photographie d'un immunoblot montrant la détection de la protéine I $\kappa$ B phosphorylée ou non phosphorylée et la protéine h- $\beta$ TrCP ou le fragment h- $\beta$ -TrCP $\Delta$ F, en présence d'anticorps anti-I $\kappa$ B $\alpha$ , anti-I $\kappa$ B $\alpha$ -S32<sup>®</sup> et 30 anti-Myc ;

- la figure 9 est la photographie d'un immunoblot montrant la détection de la protéine I $\kappa$ B phosphorylée ou non phosphorylée avec la protéine h- $\beta$ TrCP ou le fragment h- $\beta$ TrCP $\Delta$ F, en présence d'anticorps anti-I $\kappa$ B $\alpha$ -S32<sup>(P)</sup> et anti-I $\kappa$ B $\alpha$  ;
- la figure 10 est la photographie d'une boîte de Petri montrant la croissance de cellules de levure cotransformées par les plasmides contenant  $\beta$ TrCP +  $\beta$ Cat<sub>1-130</sub> ;  $\beta$ TrCP +  $\beta$ Cat<sub>1-130</sub> S33-37AA ;  $\beta$ TrCP-2 +  $\beta$ Cat<sub>1-130</sub> ;  $\beta$ TrCP-2 +  $\beta$ Cat<sub>1-130</sub> S33-37AA et  $\beta$ TrCP +  $\beta$ Cat sur milieu His+, sur milieu His- et l'expression  $\beta$ -Gal ;
- la figure 11 est une représentation graphique donnant l'expression de la luciférase (RLU/ $\mu$ g protéine) dans les cellules transfectées avec le plasmide pcDNA3, les plasmides contenant  $\beta$ -Cat  $\Delta$ N,  $\beta$ TrCP,  $\beta$ -TrCP $\Delta$ F, KIA 696 ( $\beta$ -TrCP-2) et KIA 696  $\Delta$ F ( $\beta$ -TrCP2 $\Delta$ F) ;
- la figure 12 est la photographie d'un immunoblot montrant l'étude de la stabilité de la protéine  $\beta$ -caténine détectée avec des anticorps anti- $\beta$ Cat sous l'influence de l'expression de la protéine h- $\beta$ TrCP ou du fragment h- $\beta$ TrCP $\Delta$ F détectés par l'anticorps anti-Myc.

Exemple 1 : Criblage double-hybride en levure / mise en évidence de la séquence d'ADNc de la protéine h- $\beta$ TrCP et de la protéine h- $\beta$ TrCP

On a choisi comme cible le domaine cytoplasmique de la protéine Vpu. On a procédé à la fusion des résidus d'acides aminés 28 à 81 de la protéine Vpu de l'isolat LAI de HIV-1 avec le domaine de fixation de l'ADN de Gal4 (Gal4BD). La banque d'ADNc criblée était celle des cellules Jurkat (lignée lymphocytaire T humaine, ATCC n°TIB 152) et elle a été fusionnée au domaine d'activation de Gal4 (Gal4AD) dans le vecteur pGAD1318 (BENICHOUP et al. J. Biol. Chem., 269, 30073-30076, 1994).

Le clone de 1,3 kb qui a été isolé initialement par le système double-hybride (dénommé VBP1) code pour un ADN complémentaire partiel. Cet ADNc partiel code pour un fragment de 319 acides aminés correspondant au domaine C-terminal de la protéine h- $\beta$ TrCP. Il contient sept motifs répétitifs suivis d'une

queue C-terminale de 24 acides aminés. Ces motifs répétitifs, qui sont connus, sont dénommés motifs WD parce que leur extrémité se termine habituellement par la séquence Trp-Asp (WD). On notera que les motifs WD sont impliqués dans des interactions protéine-protéine (NEER et al., *Nature*, 371, 297-300, 1994).

5 Le clone ainsi isolé a été caractérisé par séquençage d'ADN sur séquenceur automatisé Applied Biosystem connu sous la dénomination ABI 373A. La technique de séquençage d'ADN est bien connue de l'homme du métier et est décrite notamment dans l'ouvrage SAMBROOK et al., "Molecular Cloning : a Laboratory Manual" Ed. Cold Spring Harbor Press, NY, 1989.

10 Une recherche dans les banques d'ADNc a montré que ce clone est l'homologue d'une séquence codant pour la protéine  $\beta$ TrCP de Xenope identifiée préalablement par SPEVAK et al. (*Mol. Cell. Biol.*, 13, 4953-4966, 1993).

15 L'ADNc complet (2,1 kb) de la protéine h- $\beta$ TrCP, qui a la SEQ ID No. 1, a été obtenu par la technique de polymérisation en chaîne (PCR) sur une préparation de plasmide correspondant à la banque d'ADN complémentaires de cellules Jurkat, telles que définies précédemment, dans le vecteur pGAD1318.

20 En plus des sept motifs WD identifiés dans le fragment C-terminal, la protéine h- $\beta$ TrCP entière selon l'invention possède un domaine N-terminal d'environ 250 acides aminés. Le fragment N-terminal contient un motif pour lequel un consensus a été récemment défini sous le terme de boîte F et dont le rôle serait de cibler des protéines vers la machinerie de dégradation des protéines médiée par l'ubiquitine grâce à l'interaction de protéines contenant cette boîte F avec la protéine Skp1p (BAI et al., 1996, *supra*).

25 Ainsi la protéine h- $\beta$ TrCP, par ses motifs WD, est d'une part capable d'interagir avec la protéine Vpu, et d'autre part possède un motif boîte F qui interagit avec la protéine Skp1p et est donc capable de cibler les protéines vers les voies de dégradation par le protéasome.

La protéine h- $\beta$ TrCP possède 569 acides aminés et comprend une boîte F et sept motifs WD dont la position dans la séquence SEQ ID N° 2 est la suivante :

- boîte F : acides aminés 147-191,
- premier motif WD : acides aminés 259-292,
- deuxième motif WD : acides aminés 304-332,
- troisième motif WD : acides aminés 343-372,
- 5 - quatrième motif WD : acides aminés 387-415,
- cinquième motif WD : acides aminés 427-455,
- sixième motif WD : acides aminés 467-492,
- septième motif WD : acides aminés 516-544.

On a recherché si la protéine ainsi isolée avait une quelconque homologie avec 10 des protéines déjà connues en utilisant la technique, bien connue de l'homme du métier, d'alignement des séquences selon le programme de MACAW (SCHULER et al., *Proteins : structure, function and genetics*, 9, 180-190, 1991).

Les résultats obtenus sont reportés sur la figure 2 qui montre que la protéine h- $\beta$ TrCP a une homologie :

- 15 • de 88% avec la protéine x- $\beta$ TrCP1 de *Xenopus*,
- de 33% avec la protéine Met30p de *Saccharomyces cerevisiae*, inhibiteur de transcription impliqué dans la biosynthèse,
- de 31% avec la protéine Scon2p de *Neurospora crassa*.

La figure 2 montre également l'emplacement de la boîte F et des motifs WD.

#### Exemple 2 : Clonage de l'ADNc de la protéine h- $\beta$ TrCP

L'ADNc de la protéine h- $\beta$ TrCP ayant la SEQ ID N° 1 a été amplifié par PCR à partir de 2  $\mu$ g d'ADN du plasmide de la banque d'ADNc pGAD en utilisant deux tours d'amplification, le couple externe d'amorces pour le premier tour étant 25 constitué de l'amorce sens A ayant la SEQ ID N° 3 (dans pGAD1318) et de l'amorce antisens B ayant la SEQ ID N° 4 (dans VPB1) et le couple interne d'amorces pour le deuxième tour étant constitué de l'amorce sens C ayant la SEQ ID N° 5 (dans pGAD1318) et de l'amorce antisens D ayant la SEQ ID N° 6 (dans VPB1).

A la suite de cette procédure, on a isolé un fragment de 1,4 kb, souscloné dans le plasmide pGAD-VBP1 sous la forme d'un fragment 5'Spe1-3'BglII, pour reconstituer le clone pGAD-h- $\beta$ TrCP.

Les séquences codant pour VBP1 (résidus d'acides aminés 251 à 569 de la 5 protéine h- $\beta$ TrCP) ou codant pour la protéine h- $\beta$ TrCP entière ont été sousclonées dans les vecteurs pGBT9, pGEX4T2 (Pharmacia) ou pCDNA3 (uniquement pour la protéine h- $\beta$ TrCP) (Invitrogen) en utilisant des procédures standards.

Exemple 3 : Interaction spécifique de la protéine Vpu avec la protéine h- $\beta$ TrCP

10 Les résultats expérimentaux qui démontrent l'interaction spécifique de la nouvelle protéine humaine  $\beta$ TrCP avec la protéine Vpu sont illustrés sur la figure 1.

3a- Interaction entre la protéine Vpu et la protéine h- $\beta$ TrCP par le crible double-hybride décrit précédemment.

15 La figure 1A démontre l'interaction, par la technique double-hybride, de la région C-terminale de la protéine h- $\beta$ TrCP (VBP1) issue de la banque d'ADNc de cellules Jurkat (ligne 1) ou de la protéine h- $\beta$ TrCP entière (ligne 2) fusionnée au domaine d'activation de Gal4, avec le domaine cytoplasmique de Vpu fusionné au domaine de liaison à l'ADN de Gal4 ou vice-versa (ligne 5). L'interaction se manifeste par l'activation des deux gènes rapporteurs His3 et LacZ ; le gène His3 permet la pousse des levures en l'absence d'histidine (panneau -His), et le gène LacZ induit la production de  $\beta$ -galactosidase manifestée par la coloration bleue en présence du substrat X-Gal (panneau  $\beta$ -Gal). Cette interaction est spécifique puisqu'elle n'est pas retrouvée entre la protéine Vpu et le vecteur seul (ligne 4), ou 20 entre la protéine h- $\beta$ TrCP et une autre protéine telle la région cytoplasmique de CD4 (ligne 6). Le panneau + His est un panneau contrôle qui montre que toutes les combinaisons, y compris lorsqu'il n'y a pas d'interaction, poussent en présence d'histidine.

Il faut noter que la protéine h- $\beta$ TrCP n'interagit pas avec un mutant de la 30 protéine Vpu inactif, Vpuc-2/6 (ligne 3), clone muté sur les deux résidus sérine Ser 52 et Ser 56, qui sont essentiels pour l'activité de Vpu (MARGOTTIN et al,

1996, *supra*). Ce résultat démontre qu'il y a corrélation entre la capacité de Vpu à interagir avec la h- $\beta$ TrCP et son activité.

3b- Mise en évidence de l'expression de la protéine h- $\beta$ TrCP par analyse "Northern Blot".

5 Par analyse "Northern Blot" d'ARNm de différentes lignées cellulaires humaines en utilisant une sonde 5', on a trouvé que plusieurs ARN messagers (ARNm) hybrident avec une sonde correspondant à h- $\beta$ TrCP (Fig. 1B). Ces ARNm de tailles respectives 2,4 kb, 3,5 kb et 7 kb, sont retrouvés dans tous les tissus humains testés. Cette multiplicité d'ARNm est réminiscente de la situation 10 décrite par HUDSON et al. (Dev. Genet., 19, 190-198, 1996) pour les ARNm de la  $\beta$ TrCP de Xenope, pour laquelle 3 ARNm différents de tailles respectives voisines de celles trouvées ici pour les ARNm de la h- $\beta$ TrCP ont été rapportés.

3c- Mise en évidence de l'expression de la protéine h- $\beta$ TrCP par analyse "Immunoblot".

15 Des anticorps anti-peptidiques anti-h- $\beta$ TrCP (Abs) ont été produits chez des lapins par immunisation avec le peptide de synthèse 275-293 correspondant au premier motif WD de la protéine h- $\beta$ TrCP. Ces anticorps Abs ont été purifiés par affinité par adsorption sur 30  $\mu$ g de la protéine de fusion GST-VBP1, exprimée chez *E. Coli* à partir du vecteur pGEX-VBP1 et immobilisée après 20 électrobuvardage sur une membrane de nitrocellulose. Les anticorps Abs purifiés ont ensuite été élués par l'éluant glycine.HCl, pH 3,0, neutralisés avec du tampon 1M TRIS, pH 8,0, et utilisés pour une analyse, par la technique de Western blot, de l'expression de la protéine h- $\beta$ TrCP dans les cellules humaines Sup T1 (T1), dans les réticulocytes de lapins (RRL) et dans les lysats de membrane 25 microsomique canine (CMM).

La Figure 1C montre l'expression de la protéine h- $\beta$ TrCP détectée dans un lysat de cellules T humaines de la lignée Sup T1 (ligne 1), de réticulocytes de lapin de Promega (ligne 3), par la technique "Western blot" en utilisant les anticorps anti-h- $\beta$ TrCP dirigés contre le peptide 275-293 obtenus précédemment. En revanche 30 aucune protéine correspondant à la h- $\beta$ TrCP n'a pu être détectée dans des membranes de microsomes de pancréas de chien de Promega (ligne 2). La taille de

la protéine h- $\beta$ TrCP détectée ( 60 kD) indique que le clone d'ADNc de h- $\beta$ TrCP qui a été caractérisé et qui est représenté sur la figure 2 est capable de coder pour la protéine h- $\beta$ TrCP entière.

5 Exemple 4 : Cartographie des sites d'interaction entre Vpuc et la protéine h- $\beta$ TrCP

Les sites d'interaction entre le domaine cytoplasmique de la protéine Vpu (Vpuc) et la protéine h- $\beta$ TrCP de l'invention ont été déterminés de la façon suivante.

10 Au niveau de Vpuc, il a été montré que la mutation des séries aux positions 52 et 56 (clone Vpuc-2/6) abolissait intégralement l'interaction entre Vpu et h- $\beta$ TrCP.

Au niveau de h- $\beta$ TrCP, les résultats d'interaction double-hybride avec le domaine cytoplasmique de Vpu et les différents mutants décrits ci-après montrent que l'ensemble des motifs WD et la queue C-terminale sont requis pour une 15 interaction optimale, comme indiqué dans le tableau ci-après.

Les mutants utilisés sont les suivants :

- VPB1- $\Delta$ W<sub>1</sub> (clone VPB1 dont le premier domaine WD a été déleté ; résidus 292 à 569), qui correspondent à un fragment BglII-Xho1 de VBP1,
- VPB1- $\Delta$ W<sub>4-7</sub> (clone VPB1 dont les domaines WD 4 à 7 ont été déletés ; résidus 20 292 à 396), et

• VPB1- $\Delta$ C-ter (clone VPB1 dont la queue C-terminale après le 7<sup>ème</sup> domaine WD a été déletée ; résidus 292 à 545)

par PCR en utilisant respectivement l'amorce sens C, décrite précédemment, et les amorces antisens E et F suivantes dans VBP1.

25 Amorce E : SEQ ID N° 7

Amorce F : SEQ IND N° 8.

Le mutant h- $\beta$ TrCP- $\Delta$ 7W (clone h- $\beta$ TrCP dont les sept domaines WD ont été déletés ; résidus 1 à 291) a été construit en insérant un fragment Spe1-BglII à partir de la protéine h- $\beta$ TrCP dans le vecteur pGAD1318 et le mutant  $\beta$ TrCP $\Delta$ F

(résidus déletés : 32 à 179) a été obtenu par déletion du fragment AvrII-Asp718 de la protéine h- $\beta$ TrCP avec conservation du cadre de lecture.

On a vérifié que l'interaction entre les protéines Vpu et h- $\beta$ TrCP pouvait avoir lieu *in vitro* par le procédé suivant : les deux protéines ont été introduites dans du lysat de réticulocytes de lapins (RRL). Les complexes Vpu/ $\beta$ TrCP formés *in vitro* ont été identifiés par co-immunoprecipitation en utilisant des anticorps anti-h- $\beta$ TrCP dirigés contre le peptide 553-569, préparés par le même procédé que celui utilisé pour obtenir les anticorps anti-h- $\beta$ TrCP dirigés contre le peptide 275-293.

La figure 3 illustre l'interaction *in vitro* entre les protéines Vpu et h- $\beta$ TrCP. La ligne 1 montre que la protéine Vpu n'est pas reconnue par l'antisérum anti-h- $\beta$ TrCP, tandis que la ligne 5 montre qu'elle précipite en présence d'un antisérum anti-Vpu. La ligne 2 montre que les anticorps anti-h- $\beta$ TrCP sont capables de coprécipiter la protéine Vpu co-traduite *in vitro* avec la protéine h- $\beta$ TrCP. La ligne 4 montre que le double mutant de Vpu muté sur les positions Ser52 et Ser56, incapable d'induire la dégradation de CD4, n'interagit pas avec la protéine h- $\beta$ TrCP, et n'est donc pas coprécipité par des anticorps anti-h- $\beta$ TrCP, tandis que les lignes 6 et 7 montrent que ce mutant Vpu<sub>C-2/6</sub> est traduit avec la même efficacité que la protéine Vpu.

TABLEAU

Mutants à déletion de h- $\beta$ TrCP	Interaction avec Vpuc
h- $\beta$ TrCP:	+++
VBP1:	++
VBP1- $\Delta$ W1:	-
VBP1- $\Delta$ C-ter:	-
VBP1- $\Delta$ W4-7:	+
h- $\beta$ TrCP- $\Delta$ 7W:	-

Exemple 5 : Interaction entre la protéine h- $\beta$ TrCP et la protéine Skp1p

Afin de démontrer que le motif boîte F était bien fonctionnel et pouvait donc effectivement servir au ciblage vers le protéasome par l'intermédiaire de la protéine Skp1p, on a réalisé un test double-hybride entre le domaine N-terminal de 5 la protéine h- $\beta$ TrCP et la protéine Skp1p, ce qui a permis de mettre en évidence une interaction entre la protéine h- $\beta$ TrCP et la protéine Skp1p.

La protéine humaine Skp1p décrite dans BAI et al. (1996, *supra*) a été sousclonée dans le vecteur pLex10 pour une analyse d'interaction avec la protéine h- $\beta$ TrCP dans la souche de levure L40 (VOJTEK et al. Cell, 74, 205-214, 1993).

10 La figure 4 illustre les résultats obtenus. La ligne 1 de la figure 4 montre tout d'abord que la protéine h- $\beta$ TrCP interagit avec la protéine Skp1p. La ligne 2 montre que le domaine N-terminal suffit à obtenir l'interaction, alors que la ligne 3 montre que l'absence du domaine N-terminal de la protéine h- $\beta$ TrCP dans VBP1 fait perdre toute interaction avec la protéine Skp1p. Ces résultats sont des 15 arguments supplémentaires importants en faveur d'un rôle de la protéine h- $\beta$ TrCP dans la dégradation médiée par la protéine Vpu du récepteur CD4, et également corroborent les résultats de FUJITA et al. (1997, *supra*) et de SCHUBERT et al. (1997, *supra*) montrant que la dégradation du récepteur CD4 induite par la protéine Vpu devrait avoir lieu dans le protéasome. Il est à noter que le domaine 20 cytoplasmique de CD4 est incapable de se lier directement à la protéine Skp1 (ligne 4).

Exemple 6 : Modèle du réseau d'interactions impliqué dans la dégradation du récepteur CD4

25 La dégradation du récepteur CD4 induite par la protéine Vpu est effectuée par le réseau d'interactions a) entre la protéine Vpu et le récepteur CD4, b) entre la protéine Vpu et les motifs WD de la protéine h- $\beta$ TrCP et c) entre la boîte F de la protéine h- $\beta$ TrCP et la protéine Skp1p, cette dernière interaction permettant d) le ciblage du complexe Vpu/CD4 vers le protéasome.

30 Ce réseau d'interactions est illustré schématiquement sur la figure 5.

C'est par l'intermédiaire d'un tel réseau d'interactions que la dégradation du récepteur CD4 par le protéasome via la protéine Vpu est provoquée.

La dégradation du récepteur CD4 permet la libération de la protéine d'enveloppe Gp160 et donc la libération du virus HIV-1 infectieux.

5        Un des moyens pour empêcher le développement du virus HIV-1 chez le patient atteint consiste donc à empêcher la dégradation du récepteur CD4. Un des moyens pour empêcher cette dégradation au vu du procédé de dégradation ci-dessus consiste à rechercher des inhibiteurs, ou agents antiviraux anti-HIV, inhibant l'interaction soit entre la protéine Vpu et la protéine h- $\beta$ TrCP, soit entre  
10      10 la protéine h- $\beta$ TrCP et la protéine Skp1p par les procédés décrits précédemment.

Exemple 7 : Interaction entre la protéine h- $\beta$ TrCP et la protéine I $\kappa$ B

Pour ce test double-hybride en levure, on a fusionné les protéines décrites ci-dessous, soit au domaine d'activation de la transcription de Gal4 (Gal4D), soit au  
15      15 domaine de liaison de l'ADN de LexA :

-  $\beta$ TrCP = protéine humaine  $\beta$ TrCP de la présente invention,  
- I $\kappa$ B $\alpha$  ,  
- I $\kappa$ B $\alpha$  S32-36A = mutant de I $\kappa$ B $\alpha$  au niveau des séries S32 et S36 de sorte qu'il n'y a pas phosphorylation,  
20      20 - Ras = protéine contrôle,  
- Raf = protéine contrôle,  
- Vpuc = protéine Vpu cytoplasmique telle que décrite précédemment.  
Les résultats expérimentaux qui démontrent l'interaction spécifique de la nouvelle protéine humaine  $\beta$ TrCP avec la protéine I $\kappa$ B sont illustrés sur la figure 6.  
25      25 Grâce à ce test double-hybride, il est montré que :  
- les deux protéines h- $\beta$ TrCP et I $\kappa$ B sont capables d'interagir,  
- l'interaction h- $\beta$ TrCP/I $\kappa$ B est spécifique des deux hybrides puisque, lorsque l'un des deux hybrides est remplacé par un hybride avec une autre protéine telle que Gal4AD-Raf ou LexABD-Ras, il n'y a plus d'interaction, alors que ces deux  
30      30 hybrides contrôles sont capables d'interagir, et

- cette interaction est perdue quand les résidus sérines S32 et S36 de la protéine I $\kappa$ B sont mutés en résidus non phosphorylables comme Alanine.

Dans ce test, on a également observé une interaction entre la protéine VPu du virus HIV-1 et la protéine h- $\beta$ TrCP.

5

Exemple 8 : Interaction I $\kappa$ B/h- $\beta$ TrCP en cellules humaines : modulation de l'activation transcriptionnelle de gènes rapporteurs de l'activité NF $\kappa$ B par l'expression de la protéine h- $\beta$ TrCP ou de son fragment h- $\beta$ TrCP $\Delta$ F

Dans des cellules non stimulées (NS) de la lignée cellulaire 293, la protéine 10  $\beta$ TrCP humaine ou le fragment h- $\beta$ TrCP $\Delta$ F sont exprimés transitoirement à partir d'un vecteur d'expression eucaryote tel que pCDNA3 (Invitrogen), ayant inséré l'ADNc codant pour la protéine h- $\beta$ TrCP sous le contrôle d'un promoteur du cytomégalovirus fort (CMV). Une quantité de 3  $\mu$ g de ce plasmide, qui permet l'expression de la protéine h- $\beta$ TrCP ou du fragment h- $\beta$ TrCP $\Delta$ F, est cotransférée 15 par lipofectamine (Life technologies), avec 1  $\mu$ g d'un vecteur rapporteur dépendant (3Enh- $\kappa$ B-ConA Luc) ou indépendant (RSV Luc ou ConA Luc) de sites NF $\kappa$ B qui contrôlent l'expression du gène rapporteur luciférase.

Les résultats obtenus (Figure 7) montrent que le fragment h- $\beta$ TrCP $\Delta$ F est capable d'agir comme un transdominant négatif. Le fragment h- $\beta$ TrCP $\Delta$ F inhibe 20 par compétition avec la  $\beta$ TrCP endogène, l'activation de NF $\kappa$ B induite par le TNF ou l'acide okadaique (OKA). Cette activation de NF $\kappa$ B est mesurée par l'activité d'un gène rapporteur sous le contrôle d'un promoteur qui a trois sites de fixation à NF $\kappa$ B (3Enh- $\kappa$ B-ConA Luc) (Arenzana et al., 1993, J. Virol., 67, 6596-6609). En revanche, la protéine h- $\beta$ TrCP a un effet activateur sur l'activation de NF $\kappa$ B. La 25 protéine h- $\beta$ TrCP ou le fragment h- $\beta$ TrCP $\Delta$ F n'ont aucun effet sur la transcription d'un gène rapporteur dirigé par un promoteur ne contenant pas de sites NF $\kappa$ B (RSV Luc) (Invitrogen).

Exemple 9 : Utilisation d'anticorps spécifiques pour la mise en évidence de l'interaction entre la protéine h-βTrCP et la protéine IκB endogène des cellules 293 ou Hela, et de ses conséquences sur la stabilité de la protéine IκB

La stabilité des formes phosphorylées d'IκB a été analysée dans des cellules 5 293 transfectées par un plasmide contrôle, par un plasmide pcDNA (Invitrogen) exprimant la protéine h-βTrCP ou par un plasmide pcDNA exprimant le fragment h-βTrCPΔF, la protéine h-βTrCP et le fragment h-βTrCPΔF ayant été fusionnés à l'épitope myc en C-terminal de ce vecteur pcDNA. Après 36 heures, on a stimulé 10 les cellules 293 avec du TNF en présence de 100 µg/ml de cycloheximide (inhibiteur de la synthèse protéique). On a séparé les protéines cytoplasmiques en gel polyacrylamide dénaturant au SDS, puis on les a transférées sur une membrane de nitrocellulose et incubées, soit avec l'anticorps monoclonal 10B dirigé contre la partie amino-terminale d'IκB et reconnaissant toutes les formes de la protéine (α-IκBα ; JAFFRAY et al., Mol. Cell. Biol., 15, 2166-2172, 1995), soit avec un 15 anticorps polyclonal reconnaissant spécifiquement les formes phosphorylées d'IκB (α-IκBα-S32<sup>®</sup> ; 9241S, New England Biolabs), soit avec un anticorps monoclonal anti-myc dirigé contre l'épitope myc fusionné à h-βTrCP et h-βTrCPΔF et montrant l'expression de ces derniers dans les cellules transfectées (α-Myc ; SC40AC, Santa Cruz), en réalisant un Western blot (WB).

20 Les résultats obtenus (figure 8) montrent que l'expression du mutant h-βTrCPΔF s'accompagne de l'inhibition de la dégradation de IκB normalement induite par le TNF. Sous l'influence de l'expression de h-βTrCPΔF, les formes phosphorylées s'accumulent, comme montré par la réactivité des anticorps α-IκBα-S32<sup>®</sup> (panneau de droite).

25 La protéine h-βTrCP, au contraire, active la dégradation de IκBα (panneau du milieu). Le panneau inférieur concernant l'anticorps α-Myc est un panneau témoin qui montre l'expression des protéines h-βTrCP et h-βTrCPΔF.

On a également confirmé l'interaction h-βTrCP-IκB par une expérience d'immunoprecipitation.

Pour ce faire, on a transfecté des cellules Hela avec un plasmide pcDNA contrôle exprimant la  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -Gal), la protéine h- $\beta$ TrCP ( $\beta$ TrCP) ou le mutant h- $\beta$ TrCP $\Delta$ F ( $\beta$ TrCP $\Delta$ F), h- $\beta$ TrCP et h- $\beta$ TrCP $\Delta$ F ayant été fusionnés avec un épitope myc en C-terminal. Après 36 heures, on a stimulé les cellules Hela 5 pendant 15 minutes par le TNF en présence d'inhibiteurs du protéasome (z-LLL-H) (PALOMBELLA, V. et al., Cell, 78, 773-789, 1994) (z-LLL-H + TNF ; réaction +), ou laissées sans stimulation (réaction -). On a ensuite procédé soit à 10 un immunoblot direct après séparation des protéines du lysat cellulaire par gel dénaturant SDS et transfert sur une membrane de nitrocellulose incubée avec des anticorps  $\alpha$ -I $\kappa$ B $\alpha$ -S32 $^{\text{P}}$  (panneau supérieur), soit à une immunoprecipitation avec des anticorps  $\alpha$ -Myc suivie d'un immunoblot comme indiqué ci-dessus avec l'anticorps  $\alpha$ -I $\kappa$ B $\alpha$ -S32 $^{\text{P}}$  ou l'anticorps  $\alpha$ -I $\kappa$ B $\alpha$ .

Les résultats sont indiqués sur la figure 9, sur laquelle le panneau supérieur reprend les résultats uniquement du Western blot et les deux panneaux inférieurs 15 ceux de l'immunoprecipitation-Western blot, et le panneau de droite donne le patron de migration des formes phosphorylées induites par le traitement au TNF sur des cellules Hela contrôles.

La figure 9 montre, par des expériences de co-immunoprecipitation de la 20 protéine h- $\beta$ TrCP ou du fragment h- $\beta$ TrCP $\Delta$ F fusionnés avec l'épitope myc, que seule la forme phosphorylée de I $\kappa$ B $\alpha$  et non la forme non phosphorylée, est 25 associée à la protéine h- $\beta$ TrCP (colonne 4). Cette association est surtout révélée grâce à l'inhibition de la dégradation induite par le mutant h- $\beta$ TrCP $\Delta$ F (colonnes 5 et 6), et à l'utilisation d'inhibiteurs du protéasome (z-LLL-H).

25

Exemple 10 : Interaction entre la protéine h- $\beta$ TrCP et la protéine  $\beta$ -caténine

Pour ce test double-hybride, on a fusionné les ADNc codant pour les protéines décrivées ci-dessous, soit au domaine d'activation de la transcription de Gal4 (Gal4AD), soit au domaine de liaison à l'ADN de LexA (LexABD) :

30 -  $\beta$ TrCP = protéine humaine  $\beta$ TrCP de la présente invention,

- KIAA0696 ( $\beta$ TrCP-2) = protéine humaine  $\beta$ TrCP isolée par ISHIKAWA et al. (DNA Research, 5, 169-176, 1998),
- $\beta$ Cat<sub>1→130</sub> = protéine  $\beta$ -caténine normale (domaine N-terminal ; 1→130),
- $\beta$ Cat<sub>1→130</sub> S33-37AA = protéine  $\beta$ -caténine oncogène mutée sur les résidus 5 sérine S33 et S37 de sorte qu'il n'y a pas phosphorylation,
- $\beta$ Cat = protéine  $\beta$ -caténine normale entière,

Les résultats expérimentaux qui démontrent qu'il existe une interaction spécifique de la nouvelle protéine humaine  $\beta$ TrCP avec la protéine  $\beta$ -caténine sont illustrés sur la figure 10.

10 Grâce à ce test double-hybride, il est montré que :

- les deux protéines h- $\beta$ TrCP et  $\beta$ Cat<sub>1→130</sub> sont capables d'interagir,
- l'interaction h- $\beta$ TrCP/ $\beta$ Cat<sub>1→130</sub> est perdue quand les résidus sérine S33 et S37 sont mutés en résidus non phosphorylables ( $\beta$ -caténine oncogène), et
- la  $\beta$ TrCP-2 n'est pas capable de réagir ni avec la  $\beta$ -caténine non mutée, ni 15 avec la  $\beta$ -caténine mutée.

Il est à noter qu'on observe également une interaction, entre la protéine  $\beta$ -caténine entière et la protéine h- $\beta$ TrCP.

20 Exemple 11 : Activation de la transcription du gène rapporteur TCF/LEF par expression de la  $\beta$ -caténine mutée ou de h- $\beta$ TrCP ΔF dans les cellules humaines 293.

On a transfecté des cellules HEK 293 avec le vecteur rapporteur Top-TK-Luci, qui contient un multimère de sites TCF-LEF ou le vecteur rapporteur Fop-TK-Luci, qui contient un multimère contrôle inactif de sites TCF-LEF. Ces 25 constructions sont cotransfectées avec le vecteur d'expression pCDNA3 (Invitrogen), soit vide comme contrôle, soit exprimant un fragment oncogénique de la  $\beta$ -caténine, à savoir la  $\beta$ -caténine dépourvue de la partie N-terminale  $\beta$ -cat $\Delta$ N, soit exprimant la protéine h- $\beta$ TrCP ou le fragment  $\beta$ TrCP $\Delta$ F. L'activité luciférase est mesurée 24 h après la transfection et normalisée

à une activité Renilla Luciférase contrôle obtenue par co-transfection de cellules avec le vecteur RSV-Renilla (Promega).

Les résultats obtenus, qui figurent sur la figure 11, montrent que le fragment h- $\beta$ TrCP $\Delta$ F induit une activation d'un gène rapporteur contrôlé par un promoteur 5 TCF/LEF, qui répond à des modifications de niveau d'expression de la  $\beta$ -caténine (Morin P.J. et al. 1997, Science, 275, 1787-1790). Ceci indique que la dégradation de la  $\beta$ -caténine est inhibée par expression du mutant h- $\beta$ TrCP $\Delta$ F. Par contre, en ce qui concerne la protéine KIAA 0696  $\beta$ -TrCP2 dans le même système de gène rapporteur, l'effet positif induit par le KIAA 0696  $\Delta$ F ( $\beta$ TrCP2 $\Delta$ F) est beaucoup 10 plus faible que celui obtenu avec la construction équivalente  $\beta$ TrCP $\Delta$ F.

L'ensemble de ces résultats démontrent donc que c'est la protéine h- $\beta$ TrCP de l'invention, et non la protéine KIAA 0696, qui est le médiateur de la dégradation de la  $\beta$ -caténine.

15 Exemple 12 : Etude de l'expression de la protéine h- $\beta$ TrCP ou du fragment h- $\beta$ TrCP $\Delta$ F sur la stabilité de la  $\beta$ -caténine endogène des cellules Hela

On a transfecté des cellules Hela avec les quantités d'ADN indiquées sur la figure 12, exprimant soit la protéine h- $\beta$ TrCP, soit le fragment h- $\beta$ TrCP $\Delta$ F fusionnés à l'épitope myc en C-terminal dans un vecteur pcDNA (Invitrogen).

20 Après 24 heures, on a lysé les cellules et on a séparé les protéines cellulaires sur gel de polyacrylamide dénaturant SDS, on les a transférées sur membrane de nitrocellulose et on les a incubées soit avec un anticorps anti- $\beta$ -caténine ( $\alpha$ - $\beta$ Cat), soit avec un anticorps anti-myc pour la détection de l'expression de la protéine h- $\beta$ TrCP ou du fragment h- $\beta$ TrCP $\Delta$ F ( $\alpha$ -Myc) en réalisant un Western blot (WB).

25 Les résultats sont indiqués sur la figure 12 et montrent que l'expression de la h- $\beta$ TrCP augmente la dégradation de la  $\beta$ -caténine (colonne du milieu), alors que l'expression du mutant h- $\beta$ TrCP $\Delta$ F inhibe la dégradation de la  $\beta$ -caténine et conduit à son accumulation dans les cellules (colonne de droite).

Il est à noter que, dans la colonne C, on montre un contrôle de cellules Hela 30 non transfectées ; et l'astérisque indique, par le marquage non spécifique d'une

protéine cellulaire du lysat de cellules Hela que, approximativement, la même quantité de protéines cellulaires a été déposée dans toutes les pistes.

Les résultats corroborent ceux montrés dans l'exemple précédent.

## REVENDICATIONS

1. Protéine humaine  $\beta$ TrCP (h- $\beta$ TrCP) de ciblage des protéines vers les voies de dégradation par le protéasome, caractérisée en ce qu'elle a la 5 SEQ ID No.2.
2. Protéine selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est capable d'interagir avec les protéines susceptibles d'être dégradées par le protéasome, notamment celles qui possèdent le motif de phosphorylation comprenant les acides aminés Asp-Ser-Glu-Xaa-Xaa-Ser dans lequel Xaa est un acide aminé 10 naturel quelconque et dans lequel les résidus sérine sont phosphorylés.
3. Protéine selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle est capable d'interagir avec la protéine Vpu du virus HIV-I ou avec les protéines cellulaires I $\kappa$  $\beta$  ou  $\beta$ -caténine.
4. Protéine selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est capable 15 d'interagir avec la protéine Skp1p.
5. Protéine selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle comporte les motifs ci-après :
  - boîte F : acides aminés 147-191,
  - premier motif WD : acides aminés 259-292,
  - 20 - deuxième motif WD : acides aminés 304-332,
  - troisième motif WD : acides aminés 343-372,
  - quatrième motif WD : acides aminés 387-415,
  - cinquième motif WD : acides aminés 427-455,
  - sixième motif WD : acides aminés 467-492,
  - 25 - septième motif WD : acides aminés 516-544.
6. Fragments peptidiques de la protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 résultant de l'addition, la suppression et/ou le remplacement d'un ou plusieurs acides aminés, lesdits fragments peptidiques ayant conservé l'activité d'interaction avec la protéine Vpu du virus HIV-1, la protéine cellulaire I $\kappa$ B ou la protéine cellulaire  $\beta$ -caténine et/ou avec la protéine Skp1p.

7. Séquences d'acides nucléiques codant pour la protéine humaine h- $\beta$ Trcp et les fragments peptidiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisées en ce qu'elles sont constituées par :

- a) la séquence d'ADN SEQ ID No.1 et des fragments d'acides nucléiques codant pour lesdits fragments peptidiques ;
- 5 b) les séquences d'ADN hybrideant dans des conditions strictes avec les séquences ci-dessus ou un de ses fragments ;
- c) les séquences d'ADN qui, en raison de la dégénérescence du code génétique, résultent des séquences a) et b) ci-dessus et codent pour la protéine humaine h- $\beta$ Trcp ou les fragments de celle-ci ; et
- 10 d) les séquences d'ARNm et d'ADN correspondantes.

8. Utilisation de la protéine h- $\beta$ TrCP ou des fragments peptidiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 pour le criblage d'agents antiviraux anti-HIV-1 susceptibles d'inhiber l'interaction entre la protéine h- $\beta$ TrCP et la protéine Vpu.

15 9. Utilisation de la protéine h- $\beta$ TrCP ou des fragments peptidiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 pour le criblage d'agents antiviraux anti-HIV-1 susceptibles d'inhiber l'interaction entre la protéine h- $\beta$ TrCP et la protéine Skp1p.

20 10. Utilisation des séquences d'acides nucléiques selon la revendication 7 pour le criblage d'agents antiviraux anti-HIV susceptibles d'inhiber l'interaction entre la protéine h- $\beta$ TrCP et la protéine Vpu.

25 11. Utilisation des séquences d'acides nucléiques selon la revendication 7 pour le criblage d'agents antiviraux anti-HIV susceptibles d'inhiber l'interaction entre la protéine h- $\beta$ TrCP et la protéine Skp1p.

30 12. Utilisation de la protéine h- $\beta$ TrCP ou des fragments peptidiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 pour le criblage d'agents antitumoraux capables de perturber la régulation du cycle cellulaire ou des processus de dégradation des protéines dans des cellules humaines tumorales par modulation de l'interaction entre la protéine h- $\beta$ TrCP et la protéine Skp1p.

13. Utilisation des séquences d'acides nucléiques selon la revendication 7, pour le criblage d'agents antitumoraux capables de perturber la régulation du cycle cellulaire ou des processus de dégradation des protéines dans des cellules humaines tumorales par modulation de l'interaction entre la protéine h- $\beta$ TrCP et la protéine Skp1p.

14. Utilisation de la protéine h- $\beta$ TrCP ou des fragments peptidiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 pour le criblage d'agents anti-inflammatoires capables de perturber l'activation du facteur de transcription NF $\kappa$ B par inhibition de l'interaction entre la protéine h- $\beta$ TrCP et la protéine I $\kappa$ B.

15. Utilisation des séquences d'acides nucléiques selon la revendication 7 pour le criblage d'agents anti-inflammatoires capables de perturber l'activation du facteur de transcription NF $\kappa$ B par inhibition de l'interaction entre la protéine h- $\beta$ TrCP et la protéine I $\kappa$ B.

16. Utilisation de la protéine h- $\beta$ TrCP ou des fragments peptidiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 pour le criblage d'agents antitumoraux susceptibles de réactiver l'interaction entre la protéine h- $\beta$ TrCP et une protéine  $\beta$ - caténine mutée de cellules tumorales, ou entre la h- $\beta$ TrCP et la  $\beta$ - caténine normale de cellules tumorales dépourvues de la protéine APC.

17. Utilisation des séquences d'acides nucléiques selon la revendication 7 pour le criblage d'agents antitumoraux susceptibles de réactiver l'interaction entre la protéine h- $\beta$ TrCP et la protéine  $\beta$ - caténine mutée de cellules tumorales ou entre la h- $\beta$ TrCP et la  $\beta$ - caténine normale de cellules tumorales dépourvues de la protéine APC.

18. Utilisation de la protéine h- $\beta$ TrCP ou des fragments peptidiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 pour le criblage d'agents anti-Alzheimer susceptibles de réduire le taux de dégradation de la  $\beta$ - caténine par inhibition de l'interaction entre la protéine h- $\beta$ TrCP et la protéine  $\beta$ - caténine.

19. Utilisation des séquences d'acides nucléiques selon la revendication 7 pour le criblage d'agents anti-Alzheimer susceptibles de réduire le taux de

dégradation de la  $\beta$ - caténine par inhibition de l'interaction entre la protéine h- $\beta$ TrCP et la protéine  $\beta$ - caténine.

20. Utilisation de la protéine h- $\beta$ TrCP ou des fragments peptidiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 pour la détection par criblage en double-  
5 hybride en levure des mutations de la  $\beta$ - caténine.
21. Utilisation des séquences d'acides nucléiques selon la revendication 7 pour la détection par criblage en double-hybride en levure des mutations de la  $\beta$ - caténine.
22. Agents antiviraux anti-HIV qui sont constitués par les fragments  
10 peptidiques de la protéine h- $\beta$ TrCP selon la revendication 4 dénués de la boîte F.
23. Agents antiviraux anti-HIV qui sont constitués par les fragments peptidiques de la protéine h- $\beta$ TrCP selon la revendication 7 dénués des motifs WD.
24. Anticorps dirigés contre la protéine h- $\beta$ TrCP ou les fragments  
15 peptidiques tels que définis dans l'une quelconque des revendications 1 à 6.
25. Oligonucléotides antisens bloquant la transcription ou la traduction de la protéine h- $\beta$ TrCP selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 qui s'hybrident avec une séquence d'acides nucléiques selon la revendication 7.
26. Agents antitumoraux qui sont constitués par les fragments peptidiques  
20 de la protéine h- $\beta$ TrCP selon la revendication 7, qui possèdent la boîte F.
27. Agents antitumoraux qui sont constitués par les fragments peptidiques de la protéine h- $\beta$ TrCP selon la revendication 7 et qui ont conservé à la fois les motifs WD et la boîte F.
28. Agents anti-inflammatoires qui sont constitués par les fragments  
25 peptidiques de la protéine h- $\beta$ TrCP selon la revendication 7 dénués de la boîte F.
29. Animaux transgéniques exprimant un transgène de la protéine h- $\beta$ TrCP selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.
30. Animaux transgéniques dans lesquels le gène  $\beta$ TrCP a été invalidé.

31. Vecteur d'expression, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'acides nucléiques selon la revendication 7 et les moyens nécessaires à son expression.
32. Microorganismes ou cellules hôtes transformés par un vecteur d'expression selon la revendication 31.
33. Microorganismes ou cellules hôtes co-transformés par un vecteur d'expression contenant le gène codant pour la protéine Vpu et un vecteur d'expression selon la revendication 31.
34. Microorganismes ou cellules hôtes cotransformés par un vecteur d'expression contenant le gène codant pour la protéine Skp1p et un vecteur d'expression selon la revendication 31.
35. Microorganismes ou cellules hôtes cotransformés par un vecteur d'expression contenant le gène codant pour la protéine I<sub>K</sub>B et un vecteur d'expression selon la revendication 31.
36. Microorganismes ou cellules hôtes cotransformés par un vecteur d'expression contenant le gène codant pour la protéine  $\beta$ -caténine oncogène et un vecteur d'expression selon la revendication 31.

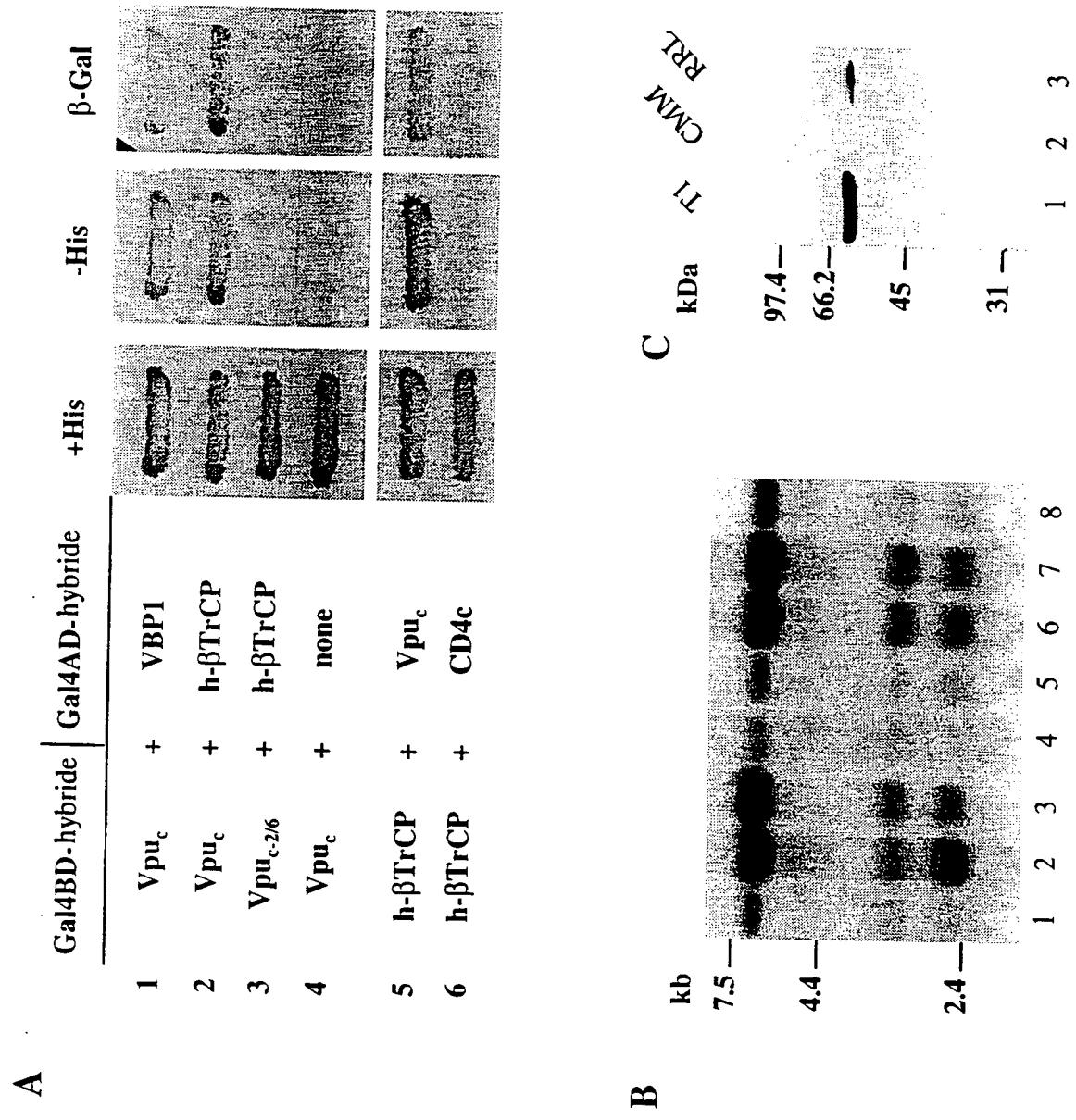


Figure 1



MDPAEAVLQEALKFMN	SSEREDCNNGEPPRI	33
MEGFSCSLQPPT	ASEREDCNRDEPPRI	28
MRRERQRMMFSFEDKOKDLDNSNSNSSEMTDTAMMPPLKRLLITGSSDDLAQGSSGRK		60
MSSVLMSTKTVTPFLREHIPSITYAPIGKPGNQETARAENPN		40
<b>IP</b> PEKNSLRQTYNSCARLCLNQETVCLASTAMKTENCVKTLANGTSSMIVPKOR		88
ITE	KNTLRQTKLANGTSSMIVPKOR	53
<b>UT</b> MATRSPSSSPDLATNDSGTRVQPLPEYNFTKFCYRENPDQFSPTHTACYKDLKRTQ		120
	SKCYCRHHD	63
<b>KLS</b> ASYEKEKELCVKYFEQWSESDOVEEVEHLISOMCH		126
<b>KLS</b> ASYEKEKELCVKYFEQWSECDQVEEVEHLISRMCH		91
EINANIAKLPLQEQSIDIHHIISKVSNNDKIRKUILDGILSTSFCFPOLSYISSELVTHM		178
MIQSELDKLTSADQAVTHVWSLPSAAPARHDLMLQGILSQLCFPOLSFVSREVNEA		121
<b>E-BOX</b>		
YQHGHINSYLPMLQRDEITALPARGLDHIAENILSYLDAKSLGAAELVCKEWYRVTSDG		186
YQHGHINTYLPMLQRDEITALPARGLDHIAENILSYLDAKSLGAAELVCKEWYRVTSDG		151
IKIDFISALPQE	LSLKILSYLDCQSLCNATRVRKWKOKLADDD	221
IKIDFISALPVE	LAQKVLCYLDTVSLTKHAQVSORWTLADSD	164
<b>MLWKKL</b> IERMVRTDSLWRGLAERRG	**	
MLWKKLIERMVRTDSLWRGLAERRG	QGYLFKNKPPDGNAAPPNSFYRALYPLIIQDIE	245
MLWKKLIERMVRTDSLWRGLAERRG	QGYLFKNKPPDGKTPPNSFYRALYPLIIQDIE	210
RVWYHMCQHQI	DRKCPNGWGLPILHMK	270
AVWVRMCEQHQI	RARIQQNSTGSSSNADIQTOT	218
	NRKCTKGWGLPILERKKLRLNYTRQRQLAKGGPQGRVTELADS	
<b>WD-1</b>		
<b>WD-2</b>		
<b>WD-3</b>		
<b>WD-4</b>		
<b>WD-5</b>		
<b>WD-6</b>		
<b>WD-7</b>		

Figure 2



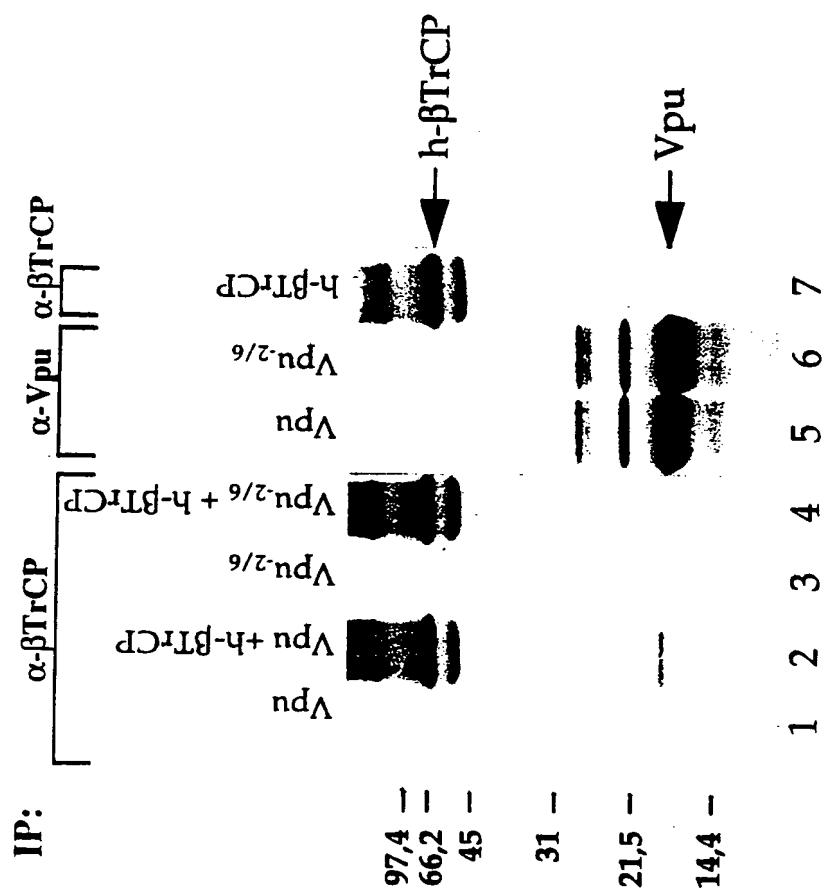


Figure 3



	LexA-hybride	Gal4AD-hybride		+His	-His	β-gal	β-Gal unités
1	Skp1p	+	h-βTrCP				18
2	Skp1p	+	h-βTrCP-Δ7W				124
3	Skp1p	+	VBP1				2
4	Skp1p	+	CD4c				2

Figure 4



Compartment luminal

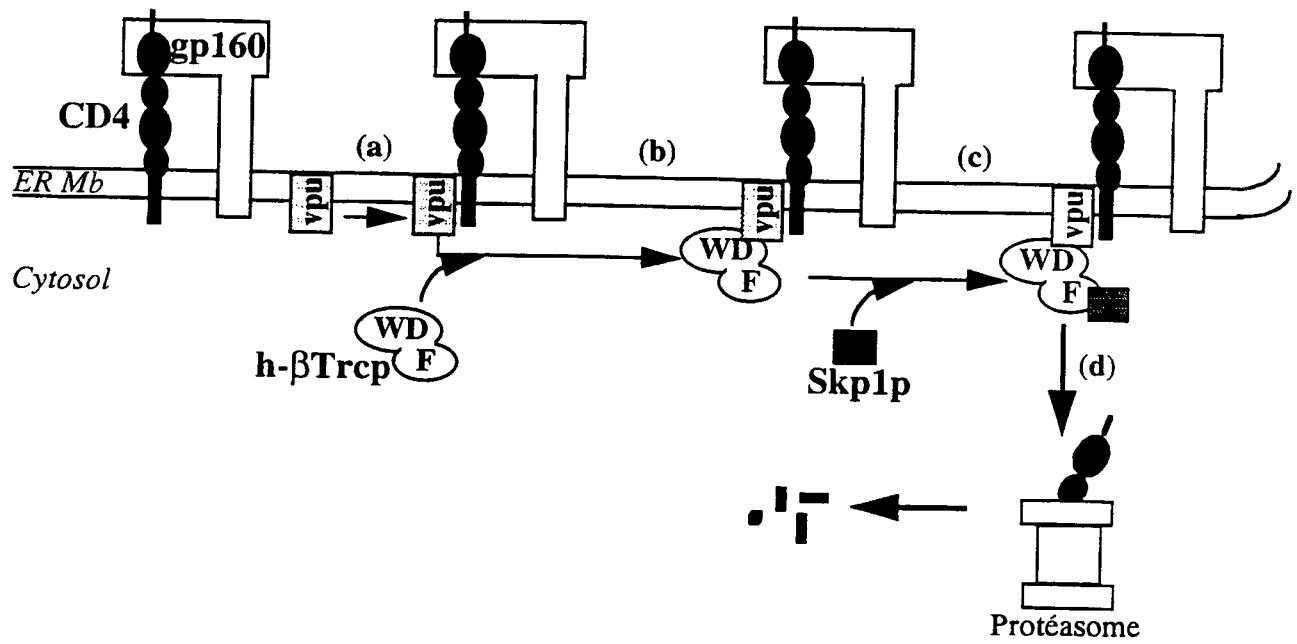


Figure 5



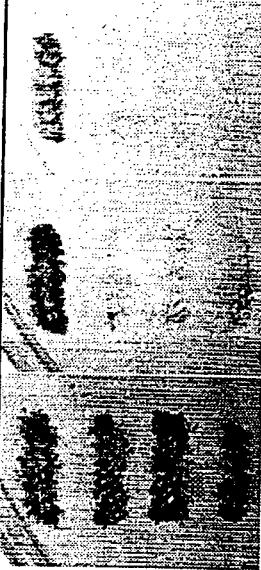
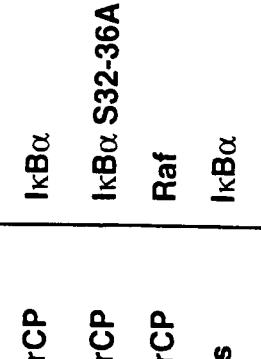
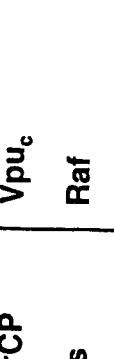
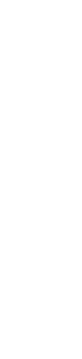
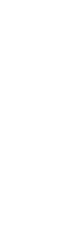
LexA BD	Gal4 AD	+His	-His	$\beta$ -Gal
$\beta$ TrCP	I $\kappa$ B $\alpha$			
$\beta$ TrCP	I $\kappa$ B $\alpha$ S32-36A			
$\beta$ TrCP	Raf			
Ras	I $\kappa$ B $\alpha$			
$\beta$ TrCP	Vpu <sub>c</sub>			
Ras	Raf			

Figure 6



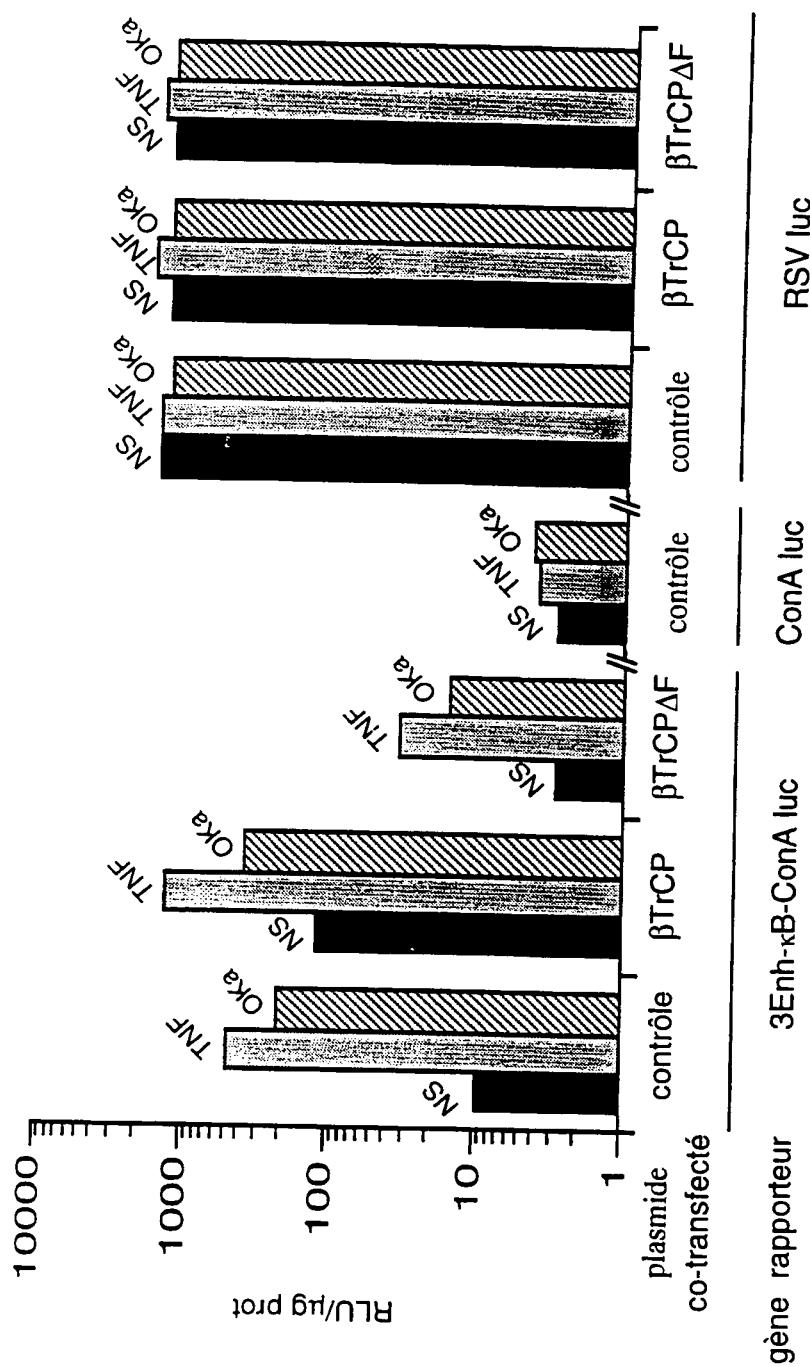


Figure 7





Figure 8



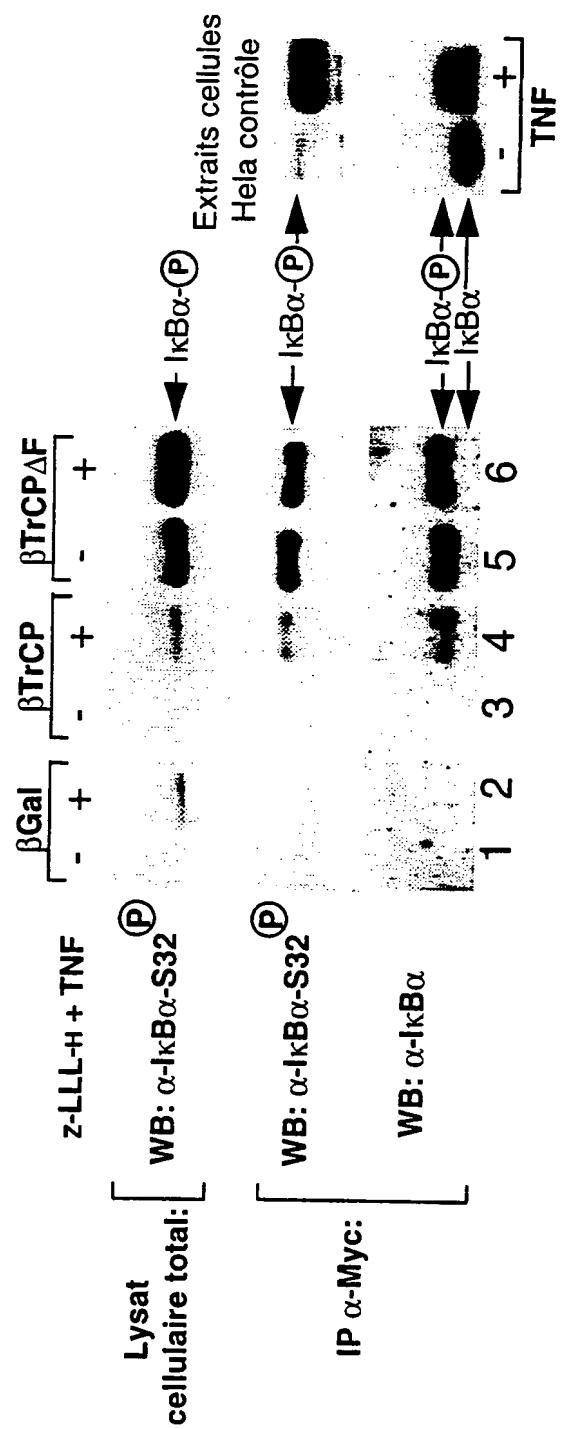


Figure 9



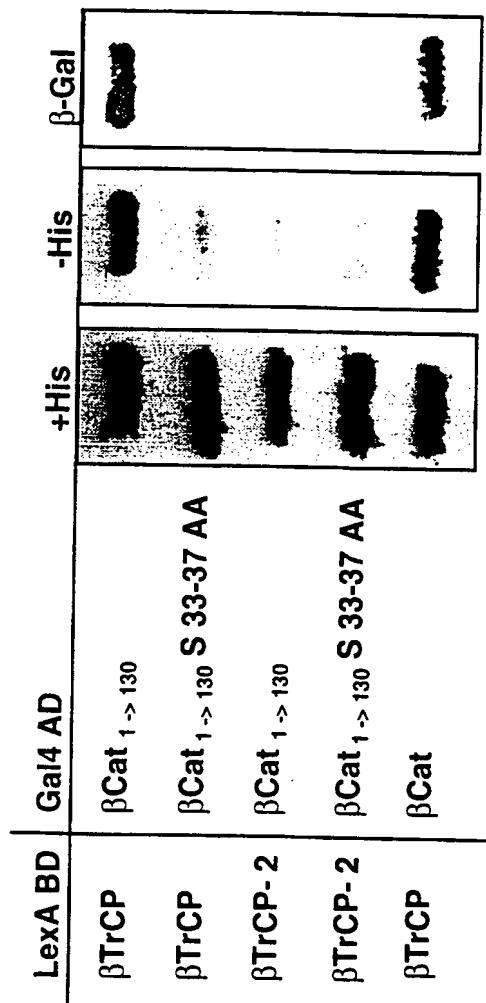
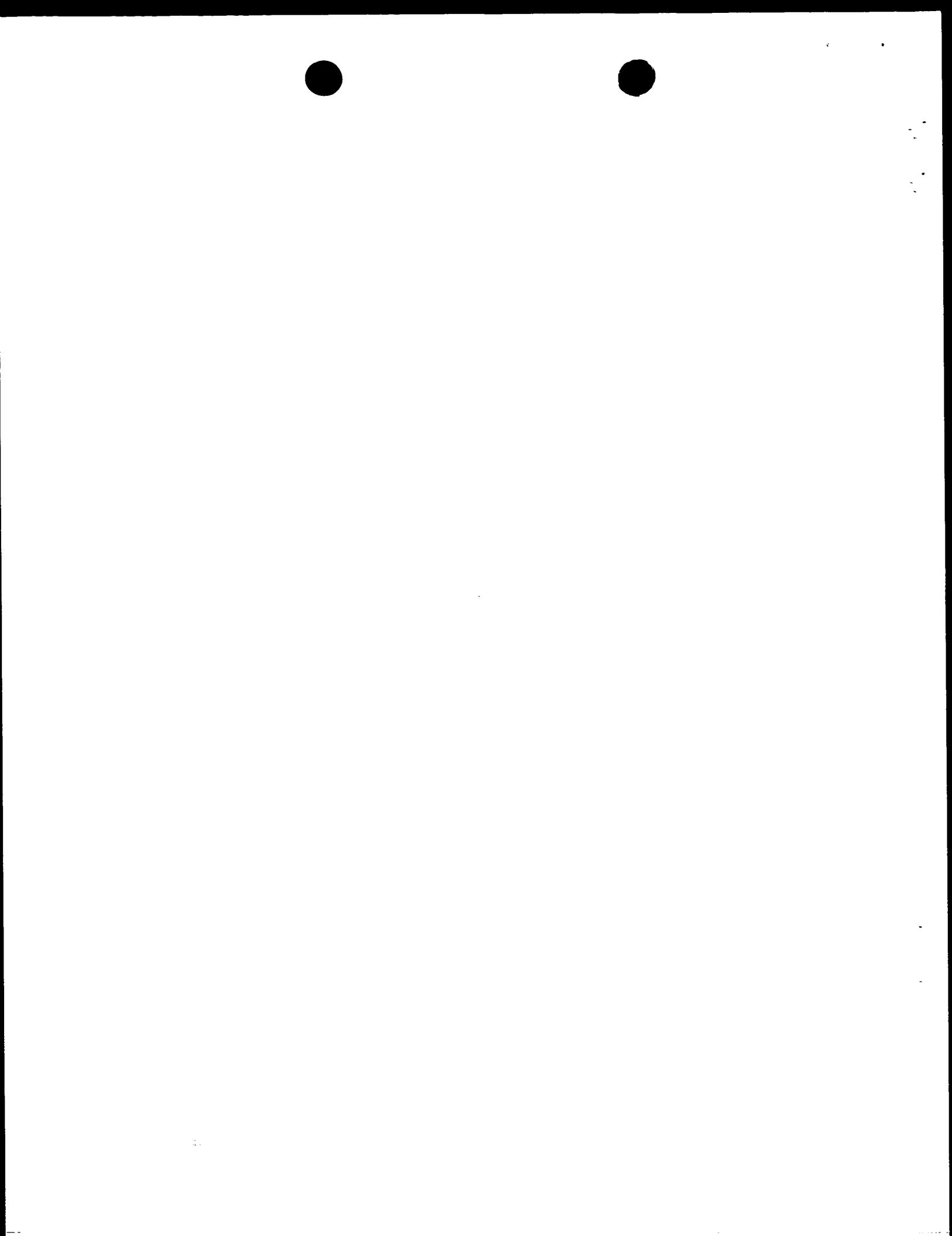
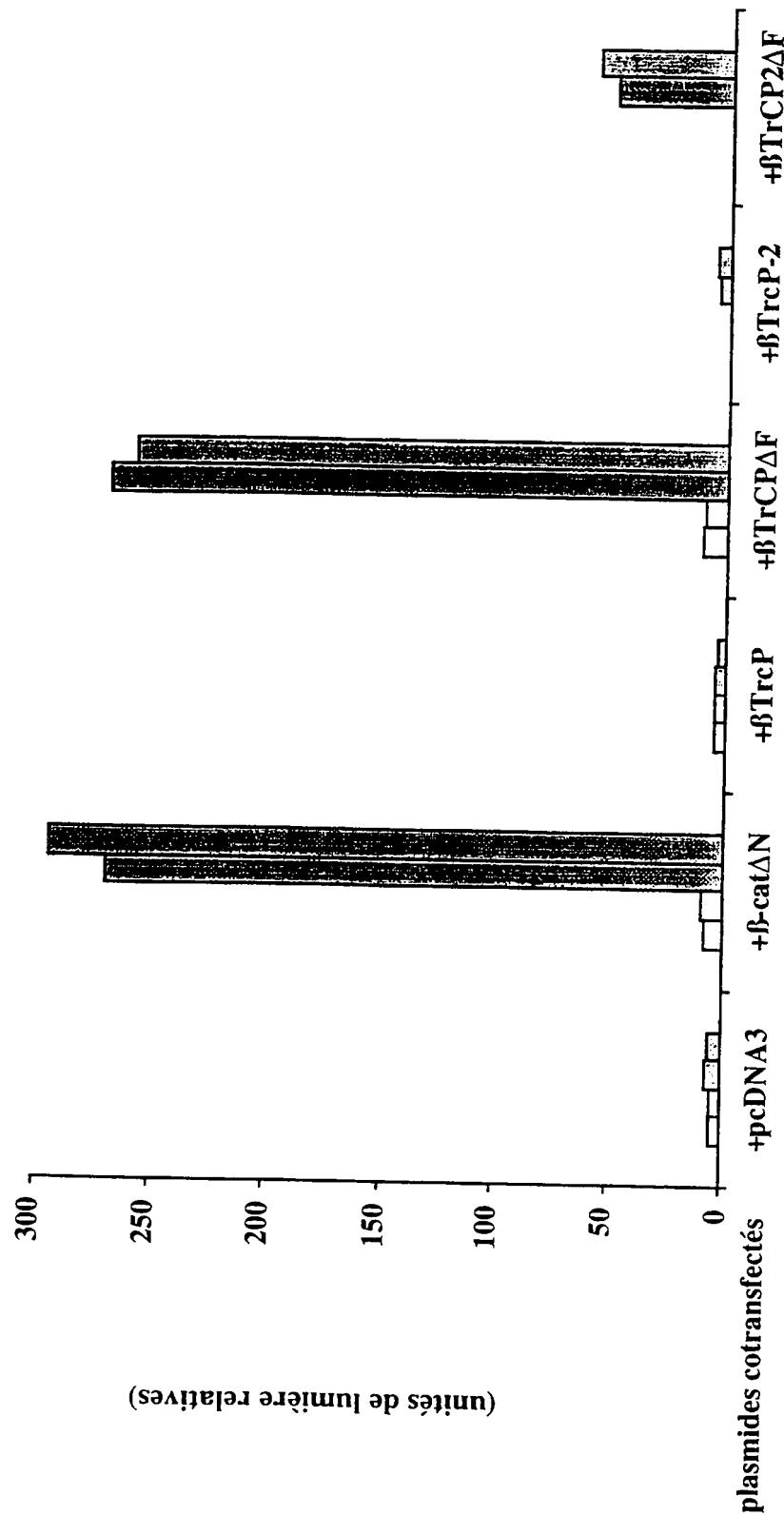


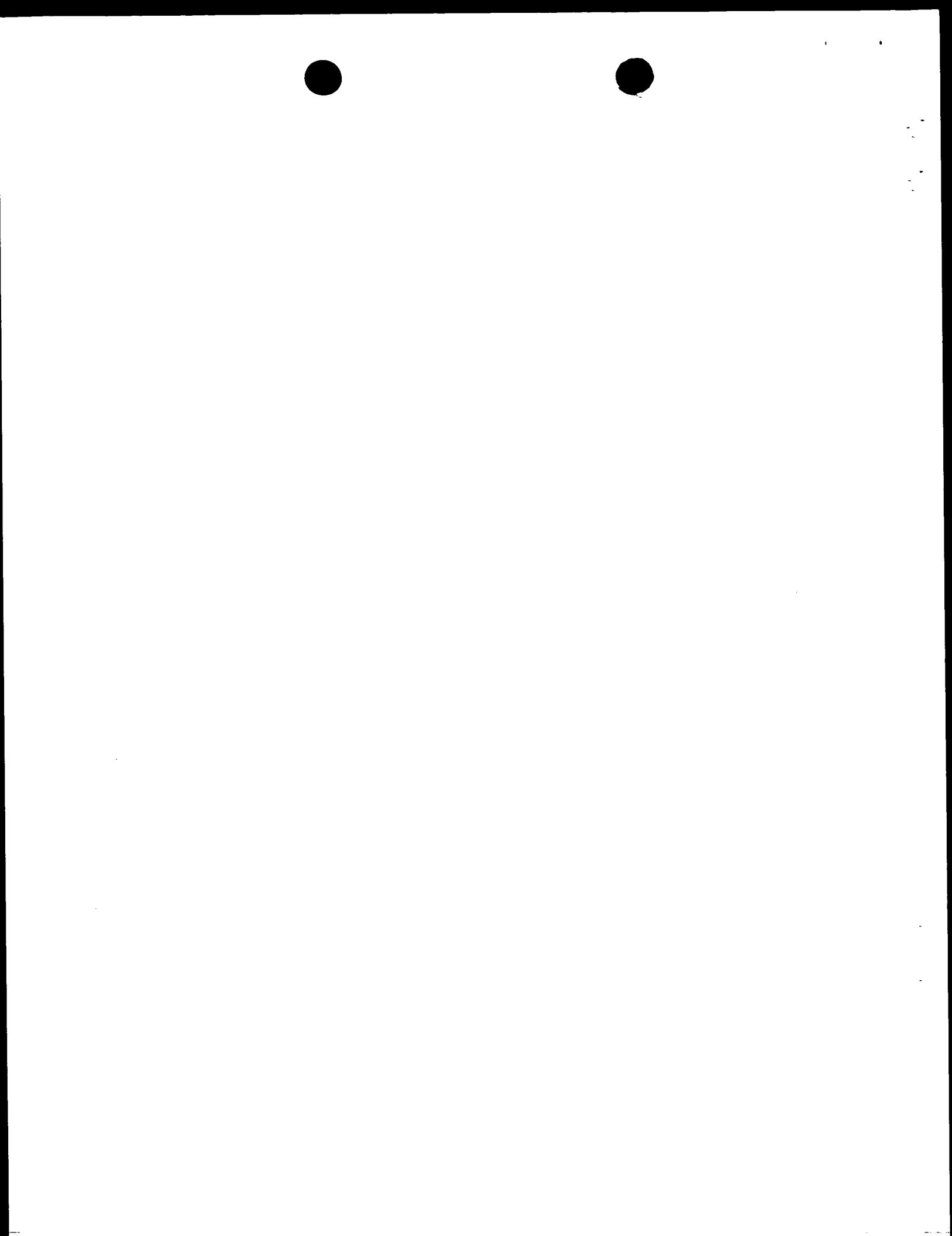
Figure 10





plasmides rapporteurs : en gris, TOP-tk-Luci ; en blanc, FOP-tk-Luci

Figure 11



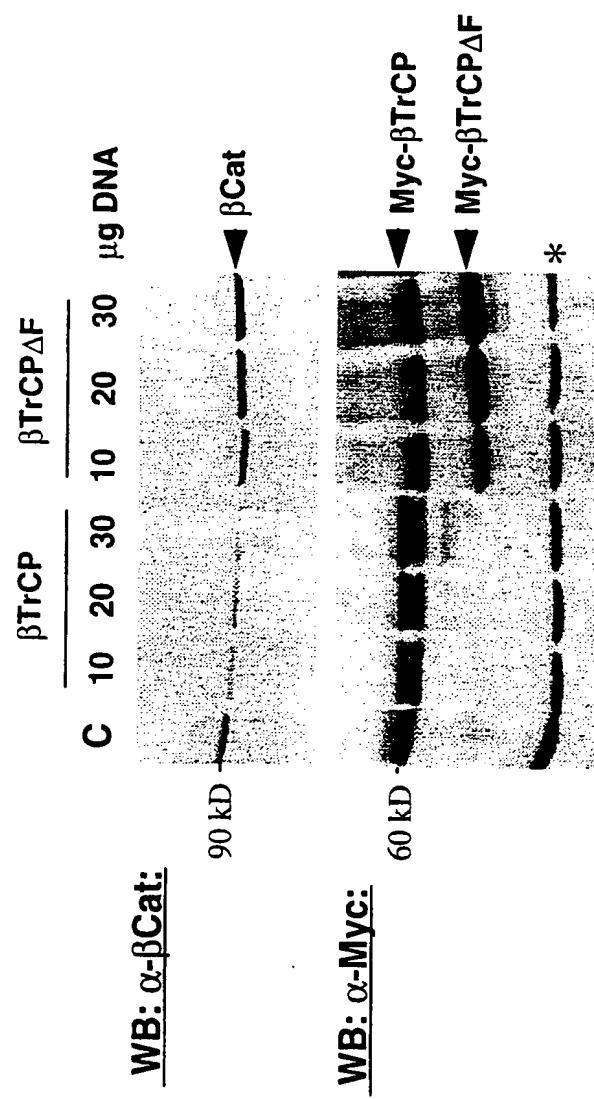
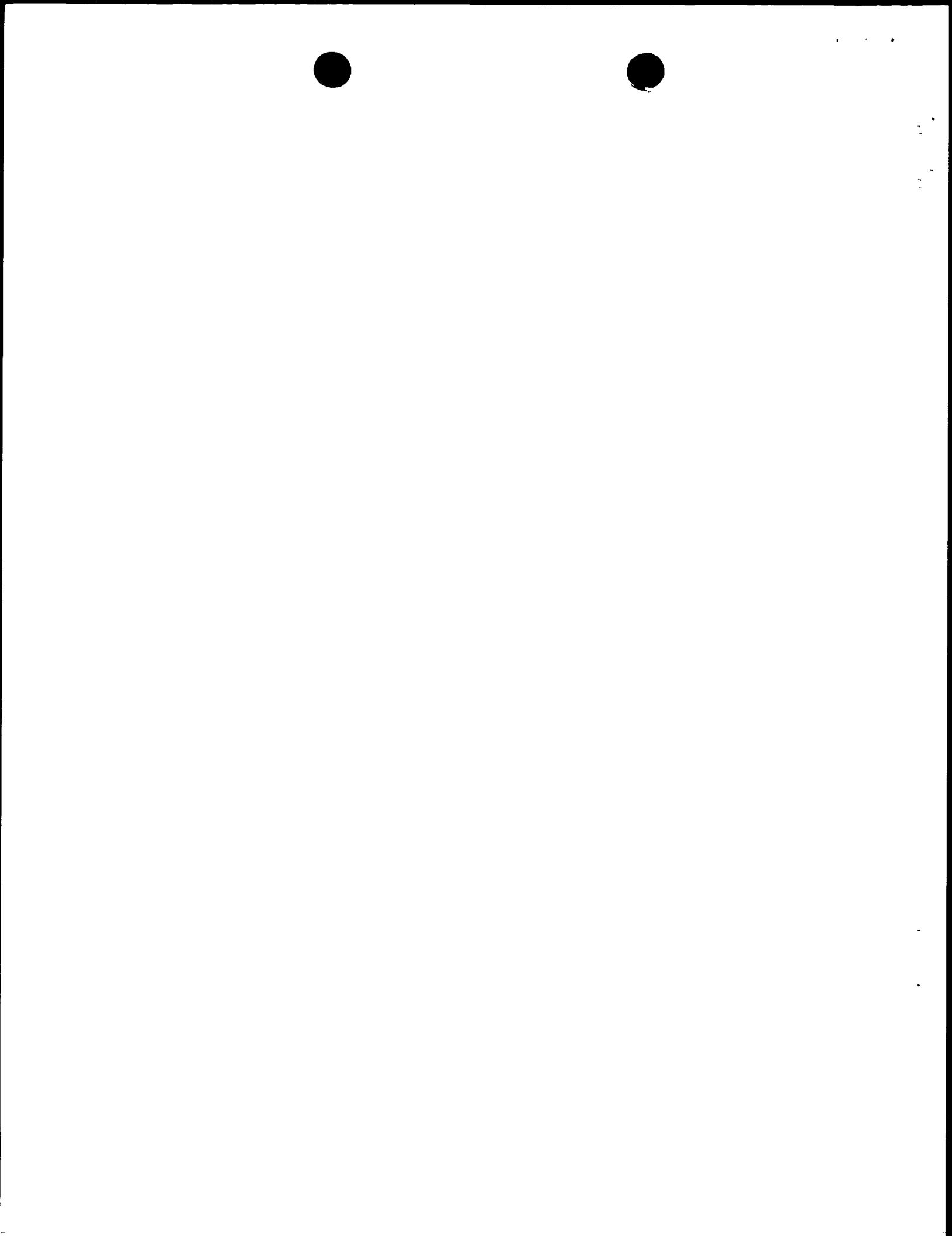


Figure 12



## LISTE DE SEQUENCES

(1) **INFORMATIONS GÉNÉRALES:**

(i) DEPOSANT:

(A) NOM: INSERM  
(B) RUE: 101, Rue de Tolbiac  
(C) VILLE: PARIS  
(E) PAYS: FRANCE  
(F) CODE POSTAL: 75654 Cédex13

(ii) TITRE DE L'INVENTION: Protéine humaine  $\beta$ TrCP de ciblage des protéines vers les voies de dégradation par le protéasome

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 8

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

(A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk  
(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible  
(C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS  
(D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

PROPRIÉTÉS DE LA SÉQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 2151 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

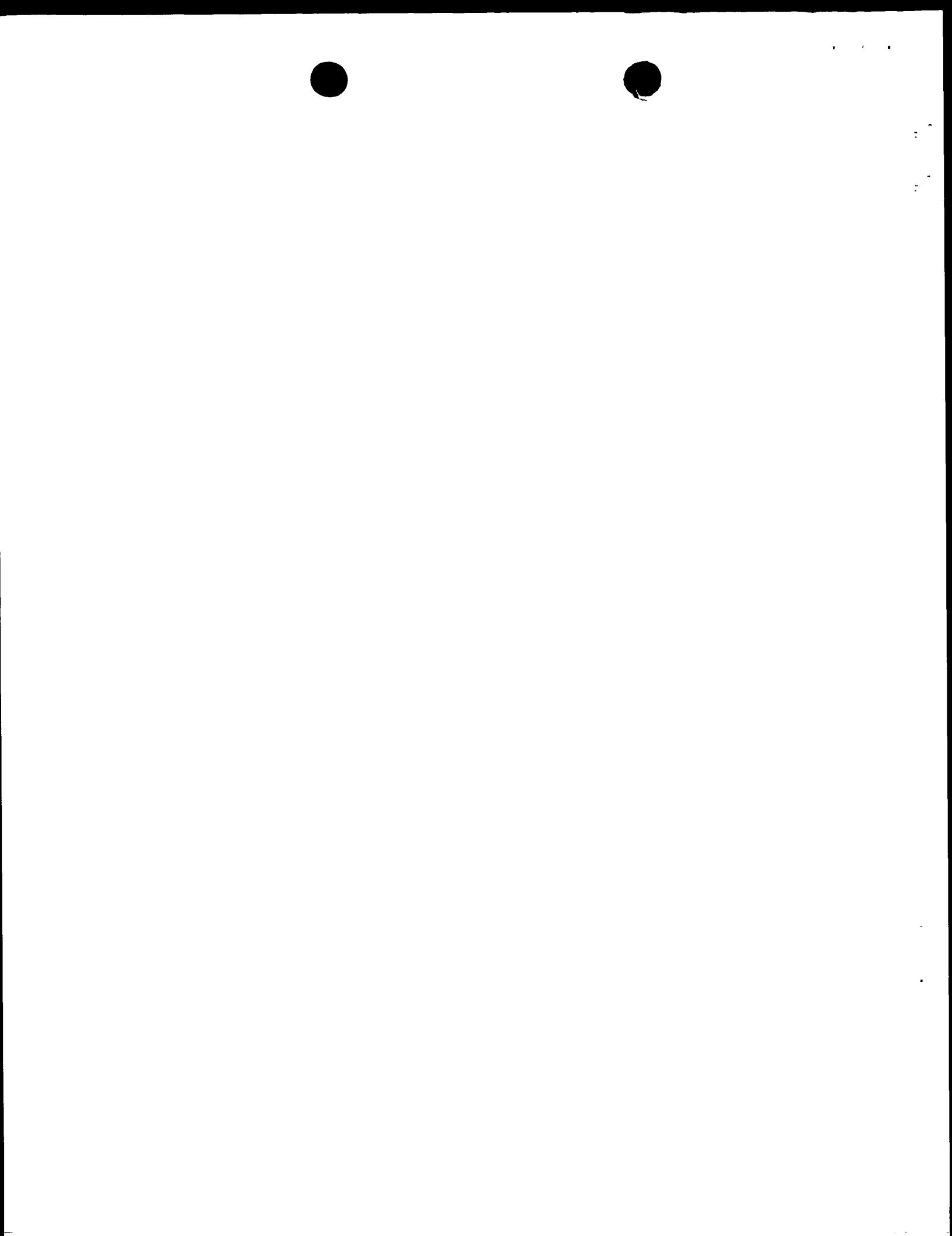
(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(ix) CARACTÉRIQUE:

(A) NOM/CLE: CDS  
(B) EMPLACEMENT: 70..1776

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

TGCGTGGCT	CGGCCCTGGC	ACCAAAGGGG	CGGCCCGGC	GGAGAGCGGA	CCCAGTGGCC	60
TCGGCGATT	ATG GAC CCG GCC GAG GCG GTG CTG CAA GAG AAG GCA CTC					108
	Met Asp Pro Ala Glu Ala Val Leu Gln Glu Lys Ala Leu					
	1	5		10		
AAG TTT ATG AAT TCC TCA GAG AGA GAA GAC TGT AAT AAT GGC GAA CCC						156
Lys Phe Met Asn Ser Ser Glu Arg Glu Asp Cys Asn Asn Gly Glu Pro						
15	20		25			
CCT AGG AAG ATA ATA CCA GAG AAG AAT TCA CTT AGA CAG ACA TAC AAC						204
Pro Arg Lys Ile Ile Pro Glu Lys Asn Ser Leu Arg Gln Thr Tyr Asn						
30	35		40		45	
AGC TGT GCC AGA CTC TGC TTA AAC CAA GAA ACA GTA TGT TTA GCA AGC						252
Ser Cys Ala Arg Leu Cys Leu Asn Gln Glu Thr Val Cys Leu Ala Ser						
50	55		60			
ACT GCT ATG AAG ACT GAG AAT TGT GTG GCC AAA ACA AAA CTT GCC AAT						300
Thr Ala Met Lys Thr Glu Asn Cys Val Ala Lys Thr Lys Leu Ala Asn						
65	70		75			



GGC ACT TCC AGT ATG ATT GTG CCC AAG CAA CGG AAA CTC TCA GCA AGC Gly Thr Ser Ser Met Ile Val Pro Lys Gln Arg Lys Leu Ser Ala Ser 80 85 90	348
TAT GAA AAG GAA AAG GAA CTG TGT GTC AAA TAC TTT GAG CAG TGG TCA Tyr Glu Lys Glu Lys Glu Leu Cys Val Lys Tyr Phe Glu Gln Trp Ser 95 100 105	396
GAG TCA GAT CAA GTG GAA TTT GTG GAA CAT CTT ATA TCC CAA ATG TGT Glu Ser Asp Gln Val Glu Phe Val Glu His Leu Ile Ser Gln Met Cys 110 115 120 125	444
CAT TAC CAA CAT GGG CAC ATA AAC TCG TAT CTT AAA CCT ATG TTG CAG His Tyr Gln His Gly His Ile Asn Ser Tyr Leu Lys Pro Met Leu Gln 130 135 140	492
AGA GAT TTC ATA ACT GCT CTG CCA GCT CGG GGA TTG GAT CAT ATC GCT Arg Asp Phe Ile Thr Ala Leu Pro Ala Arg Gly Leu Asp His Ile Ala 145 150 155	540
GAG AAC ATT CTG TCA TAC CTG GAT GCC AAA TCA CTA TGT GCT GCT GAA Glu Asn Ile Leu Ser Tyr Leu Asp Ala Lys Ser Leu Cys Ala Ala Glu 160 165 170	588
CTT GTG TGC AAG GAA TGG TAC CGA GTG ACC TCT GAT GGC ATG CTG TGG Leu Val Cys Lys Glu Trp Tyr Arg Val Thr Ser Asp Gly Met Leu Trp 175 180 185	636
AAG AAG CTT ATC GAG AGA ATG GTC AGG ACA GAT TCT CTG TGG AGA GGC Lys Lys Leu Ile Glu Arg Met Val Arg Thr Asp Ser Leu Trp Arg Gly 190 195 200 205	684
CTG GCA GAA CGA AGA GGA TGG GGA CAG TAT TTA TTC AAA AAC AAA CCT Leu Ala Glu Arg Arg Gly Trp Gly Gln Tyr Leu Phe Lys Asn Lys Pro 210 215 220	732
CCT GAC GGG AAT GCT CCT CCC AAC TCT TTT TAT AGA GCA CTT TAT CCT Pro Asp Gly Asn Ala Pro Pro Asn Ser Phe Tyr Arg Ala Leu Tyr Pro 225 230 235	780
AAA ATT ATA CAA GAC ATT GAG ACA ATA GAA TCT AAT TGG AGA TGT GGA Lys Ile Ile Gln Asp Ile Glu Thr Ile Glu Ser Asn Trp Arg Cys Gly 240 245 250	828
AGA CAT AGT TTA CAG AGA ATT CAC TGC CGA AGT GAA ACA AGC AAA GGA Arg His Ser Leu Gln Arg Ile His Cys Arg Ser Glu Thr Ser Lys Gly 255 260 265	876
GTT TAC TGT TTA CAG TAT GAT GAT CAG AAA ATA GTA AGC GGC CTT CGA Val Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asp Gln Lys Ile Val Ser Gly Leu Arg 270 275 280 285	924
GAC AAC ACA ATC AAG ATC TGG GAT AAA AAC ACA TTG GAA TGC AAG CGA Asp Asn Thr Ile Lys Ile Trp Asp Lys Asn Thr Leu Glu Cys Lys Arg 290 295 300	972
ATT CTC ACA GGC CAT ACA GGT TCA GTC CTC TGT CTC CAG TAT GAT GAG Ile Leu Thr Gly His Thr Gly Ser Val Leu Cys Leu Gln Tyr Asp Glu 305 310 315	1020
AGA GTG ATC ATA ACA GGA TCA TCG GAT TCC ACG GTC AGA GTG TGG GAT Arg Val Ile Ile Thr Gly Ser Ser Asp Ser Thr Val Arg Val Trp Asp 320 325 330	1068



GTA AAT ACA GGT GAA ATG CTA AAC ACG TTG ATT CAC CAT TGT GAA GCA Val Asn Thr Gly Glu Met Leu Asn Thr Leu Ile His His Cys Glu Ala 335 340 345	1116
GTT CTG CAC TTG CGT TTC AAT AAT GGC ATG ATG GTG ACC TGC TCC AAA Val Leu His Leu Arg Phe Asn Asn Gly Met Met Val Thr Cys Ser Lys 350 355 360 365	1164
GAT CGT TCC ATT GCT GTA TGG GAT ATG GCC TCC CCA ACT GAC ATT ACC Asp Arg Ser Ile Ala Val Trp Asp Met Ala Ser Pro Thr Asp Ile Thr 370 375 380	1212
CTC CGG AGG GTG CTG GTC GGA CAC CGA GCT GTC AAT GTT GTA GAC Leu Arg Arg Val Leu Val Gly His Arg Ala Ala Val Asn Val Val Asp 385 390 395	1260
TTT GAT GAC AAG TAC ATT GTT TCT GCA TCT GGG GAT AGA ACT ATA AAG Phe Asp Asp Lys Tyr Ile Val Ser Ala Ser Gly Asp Arg Thr Ile Lys 400 405 410	1308
GTA TGG AAC ACA AGT ACT TGT GAA TTT GTA AGG ACC TTA AAT GGA CAC Val Trp Asn Thr Ser Thr Cys Glu Phe Val Arg Thr Leu Asn Gly His 415 420 425	1356
AAA CGA GGC ATT GCC TGT TTG CAG TAC AGG GAC AGG CTG GTA GTG AGT Lys Arg Gly Ile Ala Cys Leu Gln Tyr Arg Asp Arg Leu Val Val Ser 430 435 440 445	1404
GGC TCA TCT GAC AAC ACT ATC AGA TTA TGG GAC ATA GAA TGT GGT GCA Gly Ser Ser Asp Asn Thr Ile Arg Leu Trp Asp Ile Glu Cys Gly Ala 450 455 460	1452
TGT TTA CGA GTG TTA GAA GGC CAT GAG GAA TTG GTG CGT TGT ATT CGA Cys Leu Arg Val Leu Glu Gly His Glu Leu Val Arg Cys Ile Arg 465 470 475	1500
TTT GAT AAC AAG AGG ATA GTC AGT GGG GCC TAT GAT GGA AAA ATT AAA Phe Asp Asn Lys Arg Ile Val Ser Gly Ala Tyr Asp Gly Lys Ile Lys 480 485 490	1548
GTG TGG GAT CTT GTG GCT TTG GAC CCC CGT GCT CCT GCA GGG ACA Val Trp Asp Leu Val Ala Ala Leu Asp Pro Arg Ala Pro Ala Gly Thr 495 500 505	1596
CTC TGT CTA CGG ACC CTT GTG GAG CAT TCC GGA AGA GTT TTT CGA CTA Leu Cys Leu Arg Thr Leu Val Glu His Ser Gly Arg Val Phe Arg Leu 510 515 520 525	1644
CAG TTT GAT GAA TTC CAG ATT GTC AGT AGT TCA CAT GAT GAC ACA ATC Gln Phe Asp Glu Phe Gln Ile Val Ser Ser His Asp Asp Thr Ile 530 535 540	1692
CTC ATC TGG GAC TTC CTA AAT GAT CCA GCT GCC CAA GCT GAA CCC CCC Leu Ile Trp Asp Phe Leu Asn Asp Pro Ala Ala Gln Ala Glu Pro Pro 545 550 555	1740
CGT TCC CCT TCT CGA ACA TAC ACC TAC ATC TCC AGA TAAATAACCA Arg Ser Pro Ser Arg Thr Tyr Thr Tyr Ile Ser Arg 560 565	1786
TACACTGACC TCATACTTGC CCAGGACCCA TTAAAGTTGC GGTATTTAAC GTATCTGCCA	1846
ATACCAGGAT GAGCAACAAAC AGTAACAAATC AAAACTACTGC CCAGTTCCCC TGGACTAGCC	1906



GAGGAGCAGG GCTTGAGAC TCCTGTTGGG ACACAGTTGG TCTGCAGTCG GCCCAGGACG	1966
GTCTACTCAG CACAACTGAC TGCTTCAGTG CTGCTATCAG AAGATGTCTT CTATCAATTG	2026
TGAATGATTG GAACTTTAA ACCTCCCCTC CTCTCCTCCT TTCACCTCTG CACCTAGTTT	2086
TTTCCCATTG GTTCCAGACA AAGGTGACTT ATAAATATAT TTAGTGTGTTT GCCAGAAAAA	2146
AAAAAA	2151

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 569 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

Met Asp Pro Ala Glu Ala Val Leu Gln Glu Lys Ala Leu Lys Phe Met			
1	5	10	15
10	15		

Asn Ser Ser Glu Arg Glu Asp Cys Asn Asn Gly Glu Pro Pro Arg Lys			
20	25	30	
30			

Ile Ile Pro Glu Lys Asn Ser Leu Arg Gln Thr Tyr Asn Ser Cys Ala			
35	40	45	
45			

Arg Leu Cys Leu Asn Gln Glu Thr Val Cys Leu Ala Ser Thr Ala Met			
50	55	60	
60			

Lys Thr Glu Asn Cys Val Ala Lys Thr Lys Leu Ala Asn Gly Thr Ser			
65	70	75	80
75	80		

Ser Met Ile Val Pro Lys Gln Arg Lys Leu Ser Ala Ser Tyr Glu Lys			
85	90	95	
95			

Glu Lys Glu Leu Cys Val Lys Tyr Phe Glu Gln Trp Ser Glu Ser Asp			
100	105	110	
110			

Gln Val Glu Phe Val Glu His Leu Ile Ser Gln Met Cys His Tyr Gln			
115	120	125	
125			

His Gly His Ile Asn Ser Tyr Leu Lys Pro Met Leu Gln Arg Asp Phe			
130	135	140	
140			

Ile Thr Ala Leu Pro Ala Arg Gly Leu Asp His Ile Ala Glu Asn Ile			
145	150	155	160
155	160		

Leu Ser Tyr Leu Asp Ala Lys Ser Leu Cys Ala Ala Glu Leu Val Cys			
165	170	175	
175			

Lys Glu Trp Tyr Arg Val Thr Ser Asp Gly Met Leu Trp Lys Lys Leu			
180	185	190	
190			

Ile Glu Arg Met Val Arg Thr Asp Ser Leu Trp Arg Gly Leu Ala Glu			
195	200	205	
205			

Arg Arg Gly Trp Gly Gln Tyr Leu Phe Lys Asn Lys Pro Pro Asp Gly			
210	215	220	
220			



Asn Ala Pro Pro Asn Ser Phe Tyr Arg Ala Leu Tyr Pro Lys Ile Ile  
225 230 235 240

Gln Asp Ile Glu Thr Ile Glu Ser Asn Trp Arg Cys Gly Arg His Ser  
245 250 255

Leu Gln Arg Ile His Cys Arg Ser Glu Thr Ser Lys Gly Val Tyr Cys  
260 265 270

Leu Gln Tyr Asp Asp Gln Lys Ile Val Ser Gly Leu Arg Asp Asn Thr  
275 280 285

Ile Lys Ile Trp Asp Lys Asn Thr Leu Glu Cys Lys Arg Ile Leu Thr  
290 295 300

Gly His Thr Gly Ser Val Leu Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Arg Val Ile  
305 310 315 320

Ile Thr Gly Ser Ser Asp Ser Thr Val Arg Val Trp Asp Val Asn Thr  
325 330 335

Gly Glu Met Leu Asn Thr Leu Ile His His Cys Glu Ala Val Leu His  
340 345 350

Leu Arg Phe Asn Asn Gly Met Met Val Thr Cys Ser Lys Asp Arg Ser  
355 360 365

Ile Ala Val Trp Asp Met Ala Ser Pro Thr Asp Ile Thr Leu Arg Arg  
370 375 380

Val Leu Val Gly His Arg Ala Ala Val Asn Val Val Asp Phe Asp Asp  
385 390 395 400

Lys Tyr Ile Val Ser Ala Ser Gly Asp Arg Thr Ile Lys Val Trp Asn  
405 410 415

Thr Ser Thr Cys Glu Phe Val Arg Thr Leu Asn Gly His Lys Arg Gly  
420 425 430

Ile Ala Cys Leu Gln Tyr Arg Asp Arg Leu Val Val Ser Gly Ser Ser  
435 440 445

Asp Asn Thr Ile Arg Leu Trp Asp Ile Glu Cys Gly Ala Cys Leu Arg  
450 455 460

Val Leu Glu Gly His Glu Glu Leu Val Arg Cys Ile Arg Phe Asp Asn  
465 470 475 480

Lys Arg Ile Val Ser Gly Ala Tyr Asp Gly Lys Ile Lys Val Trp Asp  
485 490 495

Leu Val Ala Ala Leu Asp Pro Arg Ala Pro Ala Gly Thr Leu Cys Leu  
500 505 510

Arg Thr Leu Val Glu His Ser Gly Arg Val Phe Arg Leu Gln Phe Asp  
515 520 525

Glu Phe Gln Ile Val Ser Ser His Asp Asp Thr Ile Leu Ile Trp  
530 535 540

Asp Phe Leu Asn Asp Pro Ala Ala Gln Ala Glu Pro Pro Arg Ser Pro  
545 550 555 560

Ser Arg Thr Tyr Thr Tyr Ile Ser Arg  
565



## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 19 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

CCAAACTGCG TATAACGCG

19

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

GGTGAATCAA CGTGTAGC

20

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

GGATGATGTA TATAACTATC

20

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

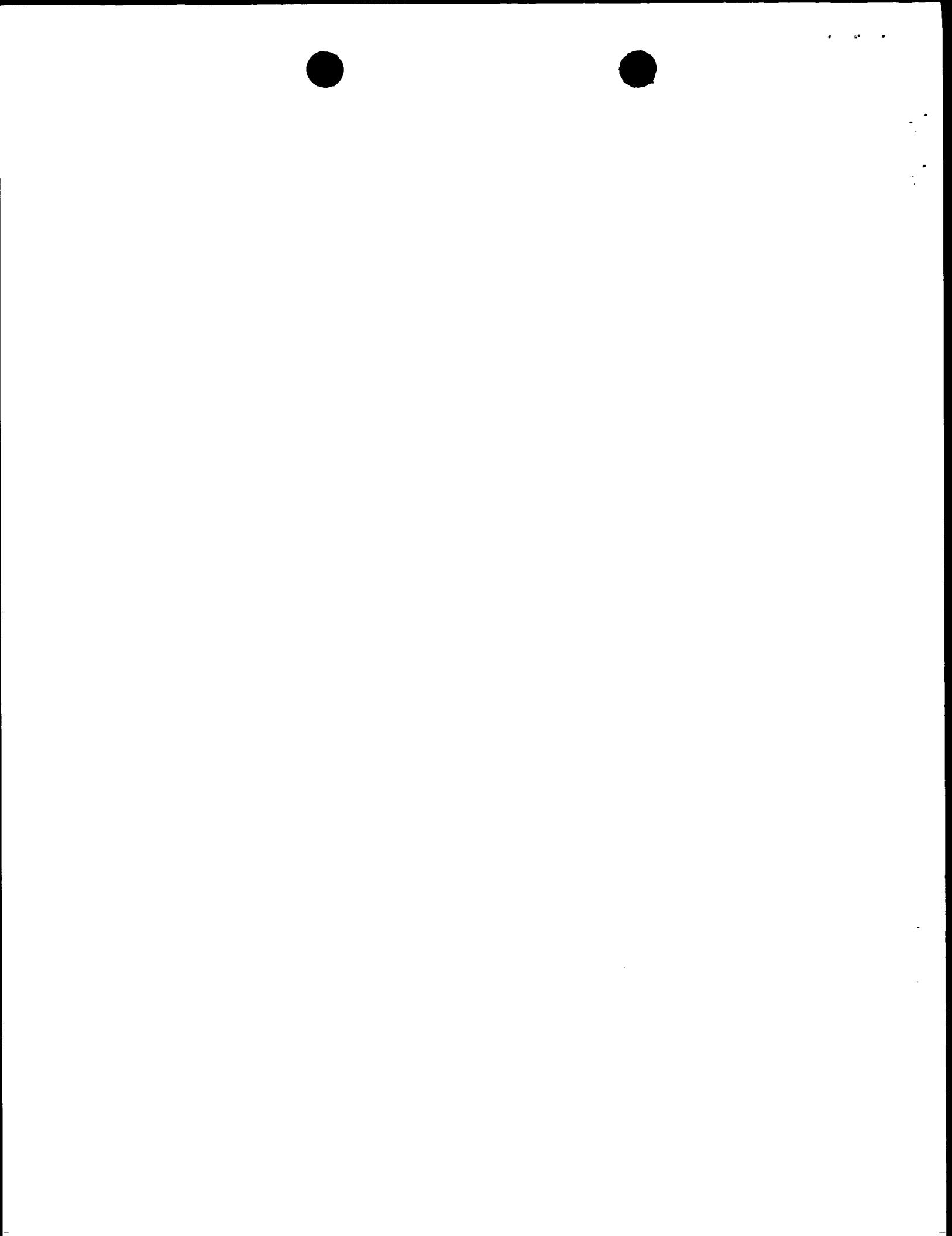
- (A) LONGUEUR: 25 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

TTTATCCCAG ATCTTGATTG TGTTG

25



## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 30 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

CCAGGATCCT TATACAACAT TGACAGCAGC

30

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 29 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

CCAGGGATCCT TAGTCCCAGA TGAGGATTG

29



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 99/00196

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/12 C07K14/47 C12N15/85 C07K16/18 A61K38/17  
A01K67/027

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 21252 A (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR) 10 August 1995 see page 1 - page 5 see page 19 - page 27 see page 80 - page 82	1-7
Y	---	8-36
X	HUDSON J.W. ET AL.: "Beta-transducin repeat containing protein-3" EMBL SEQUENCE DATABASE, 1 February 1997, XP002082116 HEIDELBERG DE Accession Nr.: P70038 see abstract ---	6,7
		-/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 May 1999

Date of mailing of the international search report

07/06/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

De Kok, A

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/00196

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MARGOTTIN F ET AL.: "Interaction between the cytoplasmic domains of HIV-1 Vpu and CD4: Role of Vpu residues involved in CD4 interaction and in vitro CD4 degradation" VIROLOGY., vol. 223, 1996, pages 381-386, XP002082117 RLANDO US cited in the application see abstract ---	8-13, 20, 22-26, 29-34
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 9629 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 96-283507 XP002082120 & JP 08 119996 A (JAPAN TOBACCO INC) , 14 May 1996 see abstract ---	1, 12, 13, 18, 19, 22, 23, 26, 31, 32
A	BAI C ET AL.: "SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box" CELL, vol. 86, no. 2, 26 July 1996, pages 263-274, XP002082118 NA US see abstract see page 267; figure 4B ---	3-6, 9, 11, 22, 26
A	NEER E.J. ET AL.: "The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins" NATURE., vol. 371, 22 September 1994, pages 297-300, XP002082119 LONDON GB see the whole document ---	1-7
A	EP 0 342 860 A (DANA FARBER CANCER INST INC) 23 November 1989 see the whole document ---	34
P, X	PATTON E E ET AL: "Combinatorial control in ubiquitin-dependent proteolysis: don't Skp the F-box hypothesis" TRENDS IN GENETICS, vol. 14, no. 6, June 1998, page 236-243 XP004121083 see page 241, column 1, last paragraph see page 242, column 1, paragraph 1 ---	1-13, 22-26, 29-34

-/-

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/00196

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	MARGOTTIN F ET AL: "A novel human WD protein, h-beta TrCP, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif" MOLECULAR CELL, vol. 1, no. 4, March 1998, pages 565-574, XP002101956 CAMBRIDGE US see the whole document ---	1-13, 22-26, 29-34
P, Y	YARON A ET AL.: "Identification of the receptor component of the IkappaBalpha-ubiquitin ligase" NATURE, vol. 396, no. 6711, 10 December 1998, pages 590-594, XP002101957 LONDON GB see abstract ---	3, 6, 14, 15, 28, 35
P, Y	LATRES E ET AL: "The human F box protein beta-TrCP associates with the Cull/Skp1 complex and regulates the stability of beta-catenin" ONCOGENE, vol. 18, no. 4, 28 January 1999, pages 849-854, XP002101958 see abstract ---	3, 6, 16-21, 27, 36
P, A	SKOWYRA D ET AL.: "The SCF ubiquitin ligase in cell cycle control and beyond" MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL, vol. 9, no. suppl., November 1998, page 240A XP002101959 see abstract -----	2

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/00196

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)			Publication date
WO 9521252	A 10-08-1995	US 5519003	A	21-05-1996	
		AU 1910095	A	21-08-1995	
		CA 2182299	A	10-08-1995	
		EP 0742824	A	20-11-1996	
		JP 9511390	T	18-11-1997	
		US 5783405	A	21-07-1998	
		US 5776716	A	07-07-1998	
EP 0342860	A 23-11-1989	US 5043262	A	27-08-1991	
		AU 633821	B	11-02-1993	
		AU 3460289	A	16-11-1989	
		JP 2138978	A	28-05-1990	
		OA 9116	A	31-10-1991	
		US 5288640	A	22-02-1994	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Int. e Internationale No

PCT/FR 99/00196

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C12N15/12 C07K14/47 C12N15/85 C07K16/18 A61K38/17  
A01K67/027

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 95 21252 A (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR) 10 août 1995 voir page 1 - page 5 voir page 19 - page 27 voir page 80 - page 82	1-7
Y	---	8-36
X	HUDSON J.W. ET AL.: "Beta-transducin repeat containing protein-3" EMBL SEQUENCE DATABASE, 1 février 1997, XP002082116 HEIDELBERG DE Accession Nr.: P70038 voir abrégé ---	6,7

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### ° Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

21 mai 1999

07/06/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

De Kok, A

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Internationale No  
PCT/FR 99/00196

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	MARGOTTIN F ET AL.: "Interaction between the cytoplasmic domains of HIV-1 Vpu and CD4: Role of Vpu residues involved in CD4 interaction and in vitro CD4 degradation" VIROLOGY., vol. 223, 1996, pages 381-386, XP002082117 RLANDO US cité dans la demande voir abrégé ---	8-13, 20, 22-26, 29-34
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 9629 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 96-283507 XP002082120 & JP 08 119996 A (JAPAN TOBACCO INC) , 14 mai 1996 voir abrégé ---	1, 12, 13, 18, 19, 22, 23, 26, 31, 32
A	BAI C ET AL.: "SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box" CELL, vol. 86, no. 2, 26 juillet 1996, pages 263-274, XP002082118 NA US voir abrégé voir page 267; figure 4B ---	3-6, 9, 11, 22, 26
A	NEER E.J. ET AL.: "The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins" NATURE., vol. 371, 22 septembre 1994, pages 297-300, XP002082119 LONDON GB voir le document en entier ---	1-7
A	EP 0 342 860 A (DANA FARBER CANCER INST INC) 23 novembre 1989 voir le document en entier ---	34
P, X	PATTON E E ET AL: "Combinatorial control in ubiquitin-dependent proteolysis: don't Skp the F-box hypothesis" TRENDS IN GENETICS, vol. 14, no. 6, juin 1998, page 236-243 XP004121083 voir page 241, colonne 1, dernier alinéa voir page 242, colonne 1, alinéa 1 ---	1-13, 22-26, 29-34
		-/-

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

en e internationale No

PCT/FR 99/00196

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P, X	<p>MARGOTTIN F ET AL: "A novel human WD protein, h-beta TrCP, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif"</p> <p>MOLECULAR CELL, vol. 1, no. 4, mars 1998, pages 565-574, XP002101956 CAMBRIDGE US voir le document en entier</p> <p>---</p>	1-13, 22-26, 29-34
P, Y	<p>YARON A ET AL.: "Identification of the receptor component of the IkappaBalpha-ubiquitin ligase"</p> <p>NATURE., vol. 396, no. 6711, 10 décembre 1998, pages 590-594, XP002101957 LONDON GB voir abrégé</p> <p>---</p>	3, 6, 14, 15, 28, 35
P, Y	<p>LATRES E ET AL: "The human F box protein beta-TrCP associates with the Cull/Skp1 complex and regulates the stability of beta-catenin"</p> <p>ONCOGENE, vol. 18, no. 4, 28 janvier 1999, pages 849-854, XP002101958 voir abrégé</p> <p>---</p>	3, 6, 16-21, 27, 36
P, A	<p>SKOWYRA D ET AL.: "The SCF ubiquitin ligase in cell cycle control and beyond"</p> <p>MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL, vol. 9, no. suppl., novembre 1998, page 240A XP002101959 voir abrégé</p> <p>-----</p>	2

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux familles de brevets

Recherche internationale

PCT/FR 99/00196

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO 9521252 A	10-08-1995	US	5519003 A	21-05-1996
		AU	1910095 A	21-08-1995
		CA	2182299 A	10-08-1995
		EP	0742824 A	20-11-1996
		JP	9511390 T	18-11-1997
		US	5783405 A	21-07-1998
		US	5776716 A	07-07-1998
EP 0342860 A	23-11-1989	US	5043262 A	27-08-1991
		AU	633821 B	11-02-1993
		AU	3460289 A	16-11-1989
		JP	2138978 A	28-05-1990
		OA	9116 A	31-10-1991
		US	5288640 A	22-02-1994